

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Ondřej Kuchler

Využití komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí pro metabolomickou analýzu houby *Gloeophyllum trabeum*

Use of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for metabolomic analysis of *Gloeophyllum trabeum* fungus

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Pavlína Kyjaková, Ph.D.

Praha 2019

Tato diplomová práce byla vypracovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze v období listopad 2017 až srpen 2019.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. srpna 2019

.....

podpis

Abstrakt

Houba *Gloeophyllum trabeum* (Agaricomycetes: Gloeophyllales), v českém jazyce známá jako Trámovka trámová, je dřevokazná houba, která produkuje široké spektrum těkavých sekundárních metabolitů. V literatuře bylo popsáno, že jedním z produkováných sekundárních metabolitů je (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol. Tato chemická látka je zároveň hlavní složkou stopovacího feromonu termitů čeledi *Rhinotermitidae*.

V této diplomové práci jsem ověřoval, zda různé kmeny *G. trabeum* produkují látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol. Dále byl studován vliv sacharidů přítomných v živných roztocích na změnu v kvalitativní a kvantitativní složení těkavých sekundárních metabolitů produkováných touto houbou. Zvolené sacharidy byly maltóza, fruktóza, sacharóza, xylóza a manóza. Analýza byla prováděna pokročilou separační technikou komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie s průletovým analyzátozem a hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC×GC-TOFMS).

Zjistil jsem, že jeden ze získaných kmenů *G. trabeum* skutečně produkuje látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol, ale pouze za specifických podmínek, tj. při kultivaci na Petriho miskách na agar – celulóзовém médiu. Toto měření bylo dále potvrzeno derivatizační reakcí dodekatrienolu se silylačním činidlem *N*, *O*-bis(trimethylsilyl) acetamidem (BSA). Pro vzorky *G. trabeum* kultivované v kapalných médiích nebyla přítomnost dodekatrienolu naměřena.

Byl naměřen rozsáhlý profil těkavých organických látek produkováných houbou *G. trabeum*, která byla kultivována v kapalných médiích. Bylo naměřeno 71 látek, které byly rozděleny do 6 skupin dle jejich chemické identity. Rozdíly ve složení jednotlivých vzorků byly vyhodnoceny statistickou metodou analýzy hlavních komponent (PCA). Vyhodnocením PCA byly identifikovány látky, které mají zvýšenou produkci, v závislosti na přítomnosti specifického sacharidu v kultivačním médiu. Zejména byl pozorován pozitivní vliv fruktózy na produkci některých esterů a seskviterpenů.

Klíčová slova: *Gloeophyllum trabeum*, stopovací feromon, (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol, termiti, komprehensivní dvoudimenzionální plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, (GC×GC-TOFMS), analýza hlavních komponent (PCA)

Abstract

Fungus *Gloeophyllum trabeum* (Agaricomycetes: Gloeophyllales) is a brown rot wood-decay fungus which produces a vast spectrum of volatile secondary metabolites. Scientific publications state, that one of the metabolites produced by *G. trabeum*, can be the substance (3Z,6Z,8E)-dodecatrien-1-ol. This chemical substance is also the main component of trail-following pheromone of *Rhinotermitidae* termite family.

In this diploma thesis, I was trying to verify whether various species of *G. trabeum* are in fact capable of producing the substance (3Z,6Z,8E)-dodecatrien-1-ol. I was also focusing on the effects of saccharides, present in nutrient solutions, on quantitative and qualitative change in composition of volatile secondary metabolites produced by *G. trabeum*. The saccharides I used for my research were - *maltose, fructose, sucrose, xylose, and mannose*. The analysis was made by using comprehensive two-dimensional gas chromatography separation technique with time-of-flight mass spectrometric detection (GC×GC-TOFMS).

During my research I discovered that one of obtained species of *G. trabeum* can produce substance (3Z,6Z,8E)-dodecatrien-1-ol, but only under specific conditions. It is produced when cultivating on Petri dishes on agar - cellulose growth media. The measurement was further validated by derivatization reaction of dodecatrienol with the silylating agent N, O-bis(trimethylsilyl) acetamide (BSA). In *G. trabeum* samples cultivated in liquid media, the presence of dodecatrienol was not found.

The outcome of my research was a measurement of broad spectrum of volatile organic compounds produced by fungus *G. trabeum*, cultivated in liquid media. I measured 71 substances in total which I divided into 6 groups according to their chemical identities. Differences in the composition of individual samples were evaluated by principal component analysis method (PCA). This method identified the substances which showed increased production due to presence of specific saccharide in the growth medium.

Keywords: *Gloeophyllum trabeum*, trail pheromone, (3Z,6Z,8E)-dodecatrien-1-ol, termites, comprehensive two-dimensional gas chromatography, mass spectrometry, (GC×GC-TOFMS), principal component analysis (PCA)

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat školitelce Mgr. Pavlíně Kyjakové, Ph.D. za odborné vedení a podporu při vypracování této práce a objasnění instrumentální techniky GC×GC-TOFMS. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Robertu Hanusovi, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování naměřených dat a cenné rady při vypracovávání této práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Křivánkovi za pomoc při kultivaci vzorků hub. Na závěr bych chtěl poděkovat vedoucí této práce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D. za trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD	10
1.1	Cíle práce.....	11
2	LITERÁRNÍ ČÁST.....	12
2.1	Chemická komunikace.....	12
2.1.1	Chemická komunikace u termitů.....	14
2.1.2	Stopovací feromony u termitů.....	14
2.2	Analytické metody analýzy přírodních látek.....	15
2.2.1	Metody izolace vzorku těkavých látek.....	16
2.2.1.1	Nástřik pevného vzorku.....	16
2.2.1.2	Extrakce do rozpouštědla	16
2.2.1.3	Headspace techniky.....	17
2.2.2	Plynová chromatografie	18
2.2.3	Komprehensivní dvoudimenzionální plynová chromatografie GC×GC.....	18
2.2.4	Detektory pro GC×GC systém	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Chemikálie	22
3.2	Přístroje a vybavení.....	23
3.3	Pomůcky.....	23
3.4	Software.....	23
3.5	Biologický materiál.....	24
3.6	Metodika a pracovní postupy.....	24
3.6.1	Druhy sacharidů obsažené v živných substrátech	24
3.6.2	Kultivace houby <i>G. trabeum</i> na pevném médiu.....	25
3.6.3	Odběr vzorků houby <i>G. trabeum</i> kultivovaných na pevném médiu	26

3.6.4	Kultivace houby <i>G. trabeum</i> v kapalném médiu	26
3.6.5	Odběr vzorků houby <i>G. trabeum</i> kultivovaných v kapalném médiu	27
3.7	Analýza vzorků systémem GC×GC-TOFMS	29
3.7.1	Optimalizované podmínky měření systémem GC×GC-TOFMS	29
3.7.2	Měření vzorků systémem GC×GC-TOFMS	30
3.7.2.1	Měření vzorků připravených pro semikvantitativní analýzu	30
3.7.2.2	Měření produkce látky dodekatrienolu houbou <i>G. trabeum</i>	30
3.8	Zpracování naměřených dat	31
3.9	Vyhodnocení a statistická analýza naměřených dat	31
4	VÝSLEDKY	34
4.1	Semikvantitativní analýza	34
4.1.1	Alkoholy	44
4.1.2	Ketony	46
4.1.3	Aldehydy	47
4.1.4	Karboxylové kyseliny	49
4.1.5	Estery karboxylových kyselin	51
4.1.6	Seskviterpeny	54
4.2	Statistické vyhodnocení naměřených výsledků	56
4.2.1	PCA estery karboxylových kyselin	60
4.2.2	PCA seskviterpeny	63
4.3	Měření a derivatizace látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol	66
5	DISKUZE	71
6	ZÁVĚR	75
7	LITERATURA	77

Použité zkratky

<i>A</i>	Plocha píku
BSA	<i>N, O</i> -bis(trimethylsilyl) acetamid
GCxGC	Komprehensivní dvoudimenzionální plynová chromatografie
DTE	(3 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-dodekatrien-1-ol
DTE-BSA	silylovaný (3 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-dodekatrien-1-ol
dodekatrienol	(3 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-dodekatrien-1-ol
FID	Plamenově ionizační detektor
<i>F. pinicola</i>	<i>Fomitopsis pinicola</i>
eV	Elektronvolt
<i>G. trabeum</i>	<i>Gloeophyllum trabeum</i>
<i>G. odorum</i>	<i>Gloeophyllum odorum</i>
Hz	Hertz
<i>m</i>	Hmotnost [gram]
mA	Miliampér
<i>m/z</i>	Relativní molekulová hmotnost / náboj
NIST	National Institute of Standards and Technology
PCA	Analýza hlavních komponent
<i>P. betulinus</i>	<i>Piptoporus betulinus</i>
RI	Retenční index
RČ	Retenční čas
s	Sekunda

SD	směrodatná odchylka
SPME	Mikroextrakce na pevnou fázi
TOFMS	Průletový analyzátor s hmotnostně spektrometrickou detekcí
V	Volt

1 ÚVOD

Všechny živé organismy, zejména bakterie, houby, rostliny a hmyz produkují svými buňkami široké spektrum sekundárních metabolitů. Tyto látky slouží jak k jejich obraně před ostatními organismy, ale také zprostředkovávají jejich vnitrodruhovou i mezidruhovou komunikaci. Ačkoliv tyto látky nejsou esenciální pro růst, rozmnožování a vývoj těchto organismů, jsou nositeli informací o prostředí, ve kterém se tyto organismy nachází a způsobují specifickou odezvu těchto organismů na přítomnost těchto látek (Bennett et al., 2012).

Tato práce se zabývá studiem těkavých organických látek, které produkuje jako své sekundární metabolity stopkovýtrusná dřevokazná houba *Gloeophyllum trabeum*. Dosavadní publikované studie, týkající se této houby, se zabývají zejména biodegradabilní mechanismy, kterými *G. trabeum* rozkládá dřevo, ze kterého získává potřebný uhlík pro svůj metabolismus. Výzkum v této oblasti je podporován zejména faktem, že dřevokazné houby způsobují znatelné ekonomické ztráty v dřevařském a lesnickém průmyslu (Jensen et al., 2001; Daniel et al., 2007). Výzkum houby *G. trabeum* není ale zaměřen pouze na její dřevokaznou funkci, v minulosti byly provedeny behaviorální pokusy s termity druhu *Reticulitermes flavipes* a bylo zjištěno, že dřevo rozkládané houbou *G. trabeum* působí přitažlivě pro tyto termity (Esenther et al., 1961). Následně bylo zjištěno, že látka, která způsobuje tuto přitažlivost je ve skutečnosti aktivní součástí stopovacího feromonu pro termitů druhy *Reticulitermes flavipes* a *Reticulitermes virginicus*, později byla tato látka izolována a identifikována jako (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol (Matsamura et al., 1968). V navazující studii pak byl zkoumán vliv různých sacharidů přítomných v živném roztoku na produkci dodekatrienolu houbou *G. trabeum*. Aktivní produkce dodekatrienolu probíhala v prostředích obsahujících xylózu, manózu, sacharózu, celulózu, glyceraldehyd, glycerol a ethylen glykol (Matsamura et al., 1976). V současné době je již obecně známo, že chemická diverzita látek, které termiti využívají jako svoje stopovací feromony, není nikterak široká, popsáno bylo pouze osm látek, které různé druhy termitů používají jako součást svých stopovacích feromonů (Bordereau a Pasteels, 2011). Taková spojitost mezi dvěma organismy, které produkují stejnou chemickou látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol, jejíž produkce dosud nebyla popsána u dalších organismů a ani není znám postup biosyntézy této látky těmito organismy, vede ke spoustě zajímavých otázek, které je

v rámci hlubšího poznání vzájemných vztahů v přírodě, i z evolučního pohledu vhodné zodpovědět.

Přestože je houba *G. trabeum* předmětem mnoha studií, v současnosti není dostupná žádná práce zabývající se celkovým profilem produkovaných těkavých organických látek touto houbou. Všechny dostupné zdroje se zabývají pouze úzkým okruhem produkovaných sekundárních metabolitů. Absence takového měření spočívá zejména v náročnosti na vybavení laboratoře, protože extrakty připravené z hub, mohou obsahovat až stovky těkavých organických látek, které mohou mít v určitém počtu stejnou teplotu varu. Provedení kompletní separace takovéto směsi analytů běžně dostupný instrumentálním vybavením je v podstatě nemožné. Pro analýzu neznámých směsí těkavých organických látek se používají instrumentální separační techniky jednodimenzionální plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem, nicméně běžná plynová chromatografie nedosahuje dostatečného chromatografického rozlišení a z toho vyplývající kapacity píků (Hung et al., 2015). Pro detailní měření komplexních směsí těkavých organických látek se používá instrumentální separační technika komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Tato technika poskytuje píkovou kapacitu až o řád vyšší než jednodimenzionální plynová chromatografie a umožňuje separaci směsi látek, které mají stejnou teplotu varu (Prebihalo et al., 2018).

1.1 Cíle práce

- Ověřit, zda houba *G. trabeum* produkuje látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol jako svůj sekundární metabolit
- Identifikovat co nejvíce těkavých organických látek, které produkuje jako své sekundární metabolity houba *G. trabeum*
- Kvantitativně vyhodnotit vliv různých sacharidů, přítomných v kultivačním médiu houby *G. trabeum*, na produkci sekundárních metabolitů

2 LITERÁRNÍ ČÁST

Všechny živé organismy produkují svými metabolickými dráhami široké spektrum chemických látek, které mají klíčovou roli v jejich životě, růstu, množení a obraně, zároveň slouží i k jejich vzájemné vnitrodruhové a mezidruhové komunikaci. Metabolismus může být definovaný jako souhrn všech biochemických reakcí provedených organismem. V principu se rozlišují dvě základní skupiny metabolitů, metabolity primární a sekundární. Primární metabolity jsou takové chemické látky, které jsou nezbytnou součástí pro růst, vývoj a množení organismů, takové látky jsou například nukleové kyseliny, bílkoviny, sacharidy a lipidy. V principu se jedná o chemické látky, které se vyskytují ve všech živých organismech, a jejich nedostatek vede ke zkrácení života organismu (Murphy a Horgan, 2005). Sekundární metabolity jsou naopak látky, které nejsou esenciální pro růst a množení organismů a jedná se o heterogenní skupinu chemických látek, které jsou specifické pro daný rod či druh organismu. Sekundární metabolity se vyskytují v obrovské diverzitě, která je způsobená velkým počtem možných izomerních konfigurací, jež jsou tvořeny ze stejných stavebních bloků. Tyto látky, ačkoliv jejich produkce nevede k přímému zvýšení růstu či vývoje organismu, mají širokou škálu funkcí od získání konkurenčních výhod mezi organismy, zprostředkování symbiotického soužití organismů pro vnitrodruhovou nebo mezidruhovou komunikaci mezi organismy (Arnold a Aiqi, 2001). V neposlední řadě zastávají obrannou funkci před mikro- a makropredátory či mikroorganismy a patogeny (Zaynab et al., 2018). Pro jejich analýzu se využívá široké spektrum instrumentálních analytických metod, které slouží k jejich identifikaci a kvantifikaci.

2.1 Chemická komunikace

Chemická komunikace patří mezi nejrozšířenější komunikační kanál mezi organismy. Vyskytuje se ve všech organismech, probíhá na buněčné úrovni ale i na úrovni makroorganismů. V principu probíhá komunikace vždy tak, že odesílatel vyšle zprávu, kterou dokáže příjemce detekovat a interpretovat. Vyslaná zpráva je zprostředkovávána právě sekundárními metabolity produkovánými organismy. Jejich vysoká strukturní diverzita, ačkoliv jsou mnohdy tvořeny ze stejných stavebních bloků, umožňuje syntézu jedinečných látek, které zprostředkovávají zprávu mezi organismy. Přijímačem zprávy je pak bílkovinný receptor navázaný na buněčné membráně buňky, což vede ke spuštění

specifické odezvy. Chemická komunikace je klíčová pro rozmnožování, růst a morfologické změny u bakterií a hub (Cottier a A Mühlischlegel, 2012), nezastupitelnou roli pak hraje také v případě živočichů, včetně hmyzu.

Hmyz, je schopen své okolí vnímat s pomocí sluchu, zraku, hmatu a především právě pomocí chemických látek. Chemická komunikace zastává v životě hmyzu klíčovou roli, zasahuje do všech jeho aspektů od rozmnožování, hledání potravy či partnera nebo při řízení morfologických změn při jeho vývoji (Nascimento a Morgan, 1996). Největší vliv má chemická komunikace, která je zprostředkována chemickými látkami zvanými semiochemikálie, na hmyz společenský, mezi které se řadí termiti, vosy, včely, čméláci a mravenci, ale také několik rodů mšic a třásněnek. Tento hmyz žije ve společných hnízdech či koloniích, v nichž se vyskytuje určitý stupeň společenské organizace. Semiochemikálie jsou produkovány v celé řadě exokrinních žláz vyskytujících se v tělech hmyzu. Tyto žlázy se skládají ze shluku sekrečních buněk, které vylučují své produkty do tělních orgánů nebo přímo ven z těla (Valterová a Urbanová, 1997).

Semiochemikálie lze rozdělit do dvou hlavních tříd na základě toho, zda se jedná o výměnu informace v rámci druhu nebo mezidruhově. Allelochemikálie jsou chemické látky, které zprostředkovávají komunikaci mezidruhově a jsou dále děleny do dalších tří podtříd na základě toho, kdo získá výhodu z vyslaného signálu, zdali odesílatel či příjemce. Allomony zprostředkovávají informaci, ze které má prospěch odesílatel. Kairomony zprostředkovávají informaci, ze které má prospěch příjemce. Synomony zprostředkovávají informaci, ze které má prospěch jak odesílatel, tak příjemce (Francke a Schultz, 1999). Látky zprostředkovávající komunikaci v rámci druhu jsou nazývány feromony. Jejich dělení je založeno na době působení a biologické funkci, kterou moderují. Dělení na základě doby působení je do dvou tříd feromony spouštěče (releaser), jež způsobují okamžitou, ale vratnou změnu v chování příjemce a feromony působky (primer), které jsou zodpovědné za opožděnou, ale dlouhotrvající fyziologickou reakci (Guerrero, 2009). Dělení založené na základě biologické funkce, kterou feromony moderují, je do následujících podtříd. Pohlavní feromony, způsobují přitažlivost a stimulaci při páření, stopovací feromony, značí cestu ke zdroji potravy, značkovací feromony, slouží k označování území, poplašné feromony, slouží k varování členů kolonie a agregační feromony, které slouží ke svolání ostatních členů kolonie (Francke a Schultz, 1999; Regnier a Law, 1968).

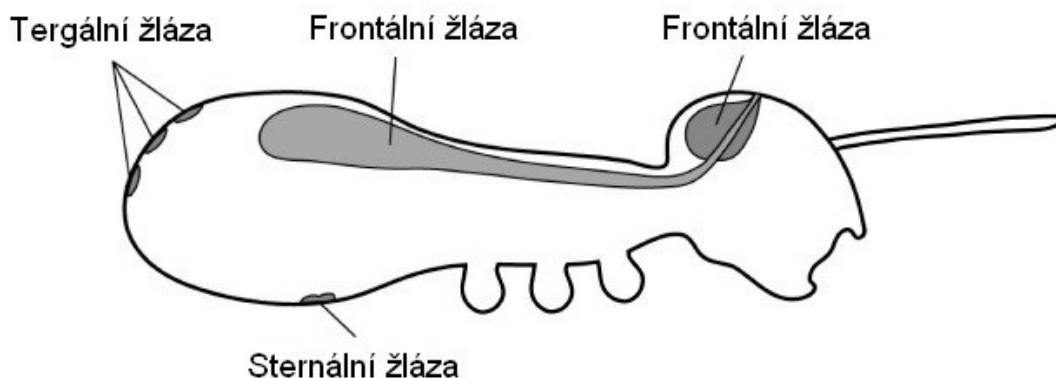
Z chemického pohledu jsou semiochemikálie uhlíkaté těkavé látky s nízkou molární hmotností, které se snadno vypařují při běžné teplotě (Bennett et al., 2012). Mezi semiochemikálie patří široké spektrum uhlíkatých látek s různými strukturními typy, například alifatické nasycené/nenasycené uhlovodíky, terpeny, aromatické látky, atd.. Tyto látky dále mohou obsahovat různé typy navázaných funkčních skupin například hydroxylové, karboxylové, esterové, étherové, aldehydické, atd. (Francke a Schultz, 1999).

2.1.1 Chemická komunikace u termitů

Chemická komunikace u termitů je řízena chemickými látkami, které jsou vylučovány z různých exokrinních žláz, které jsou umístěny na jejich tělech. Tyto látky jsou velice důležité, protože termiti nemají zrak, proto tyto látky hrají nezastupitelnou roli při vnímání okolí, ale mají vliv i na jejich vývoj. Semiochemikálie tedy v termitích koloniích ovlivňují takové funkce jako hledání potravy, obranu, rozdělení kolonie, hledání partnerů a regulaci množství přítomných kast v kolonii. Látky, které jsou zodpovědné za moderaci těchto funkcí, jsou předmětem dlouhodobého výzkumu, jejich výzkum a analýza není jednoduchá, vyžaduje použití citlivých a selektivních analytických instrumentálních metod (Costa-Leonardo et al., 2009).

2.1.2 Stopovací feromony u termitů

Získávání potravy je řízeno stopovacími feromony, které jsou vylučované z jediného zdroje, a to sternální žlázy, která je umístěna na břišní straně termitího zadečku. Umístění nejdůležitějších exokrinních žláz na těle termitů je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1 Nejdůležitější exokrinní žlázy na tělech termitů (Bagnères a Hanus, 2015).

Přítomnost této žlázy byla potvrzena u všech termitích kast a u všech termitích druhů, které byly v tomto ohledu studovány, ačkoliv přesná pozice této žlázy se liší mezi jednotlivými vývojovými větvemi termitů (Noirot, 1969).

Chemická diverzita termitích stopovacích feromonů je překvapivě nízká, pouze osm různých látek bylo identifikováno jako hlavní nebo minoritní komponenty stopovacích feromonů u více než 60 druhů z šesti čeledí (Bordereau a Pasteels, 2011). Behaviorální studie provedené na termitech nasvědčují tomu, že stopovací feromony termitů mohou být vícesložkové směsi, které obsahují aktivní komponentu, která vyvolává stopovací reakci (Traniello, 1982).

Běžné aktivní komponenty, které jsou součástí stopovacích feromonů u vyšších termitů, jsou mono-, di- a tri- nenasycené alkoholy s hlavním řetězcem dvanácti uhlíků (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodekatrien-1-ol, (3*Z*)-dodeken-1-ol a (3*Z*,6*Z*)-dodekadien-1-ol a diterpenický uhlovodík neocembren (Costa-Leonardo et al., 2009; Saran et al., 2007). Dodekatrienol se vyskytuje u čeledi termitů *Rhinotermitidae*, u některých druhů v kombinaci s diterpenem neocembrenem (Bordereau a Pasteels, 2011). Behaviorálními pokusy bylo zjištěno, že extrakty připravené z dřeva infikovaného dřevokaznou houbou *G. trabeum* vedou k odezvě stejné jako u stopovacích feromonů. Tato odezva je způsobena tím, že houba *G. trabeum* produkuje látku (3*Z*,6*Z*,8*E*)-dodekatrien-1-ol (Matsamura et al., 1968).

2.2 Analytické metody analýzy přírodních látek

Hlavním úkolem při analýze přírodních látek je „získat maximální množství informací při použití minimálního množství vzorku“ (Millar a Haynes, 1998). Z tohoto důvodu, se využívá široké spektrum analytických instrumentálních technik pro jejich identifikaci a analýzu. Většina vzorků, které jsou zkoumány, jsou vícesložkové směsi, které mohou obsahovat rozmanité skupiny látek, které se mohou lišit svojí polaritou či povahou přítomných funkčních skupin. Pro správnou identifikaci jednotlivých látek obsažených ve směsi, je zapotřebí jednotlivé složky od sebe separovat, proto základní role při studiu přírodních látek náleží separačním metodám. Pro separační analýzu těkavých organických látek, produkovaných organismy, se využívají instrumentální metody

plynové chromatografie. Techniky kapalinové chromatografie jsou využívány pro analýzu netěkavých látek a makromolekul. K dobře provedené separační analýze patří i volba vhodného detektoru. Dále se využívají techniky spektroskopické a spektrometrické, které poskytují informace o strukturní podobě molekuly, mezi tyto techniky patří nukleární magnetická rezonance, hmotnostní spektrometrie a infračervená spektroskopie. Samostatnou kapitolou je pak způsob izolace analytu ze vzorku, většinou se jedná o extrakci z biologického materiálu do organického rozpouštědla nebo headspace techniky extrakce z plynné fáze na sorpční pevnou fázi.

2.2.1 Metody izolace vzorku těkavých látek

Získání reprezentativního vzorku je první krok v analytickém procesu, zároveň jeho provedení ovlivňuje celý výsledek analýzy. Správný postup při vzorkování by měl vést ke zlepšení chromatografického chování analytů, zlepšení detekčních limitů a izolace analytů z biologické matrice (De Koning et al., 2009).

2.2.1.1 Nástřik pevného vzorku

Vzorek biologického materiálu o hmotnosti několika miligramů je vložen do skleněné kapiláry, která je umístěna do vychladlého inletu. Následně je kapilára rozdrcena kovovým pístem a inlet je zahřát na provozní teplotu, z pevného vzorku se uvolňují těkavé látky a vstupují do chromatografické kolony. Výhodou této techniky vzorkování je absence použití rozpouštědla. Nevýhody jsou pak možnosti pouze jedné analýzy z jednoho vzorku a kontaminace inletu před dalším měřením (Attygalle a Morgan, 1988).

2.2.1.2 Extrakce do rozpouštědla

Nejrozšířenější a uživatelsky nejprístupnější metodou izolace těkavých látek je technika extrakce do kapalného rozpouštědla. Jedná se o rychlou a levnou extrakční techniku, která ale má několik nevýhod. Nevýhodou je například nízká selektivita extrahovaných látek, což může vést ke vzniku komplexních směsí obsahujících těkavé ale i netěkavé látky, takže mohou být potřeba další kroky pro izolaci čistých látek. Dále je pro extrakci používán značný objem rozpouštědla, což vede ke snížení koncentrace analytů v extraktu, proto je zapotřebí nadbytek extrakčního rozpouštědla odpařit. Při odpařování může hrozit, že zároveň s odpařením rozpouštědla může dojít k odpaření extrahovaných analytů (Millar a Haynes, 1998).

2.2.1.3 Headspace techniky

Termín „headspace“ odkazuje na extrakci těkavých látek z plynné fáze, která je v rovnováze nebo nerovnováze se svojí matricí, nad pevným či kapalným vzorkem, jenž je uzavřený v nádobě. Tyto techniky se dělí na statické a dynamické. (Soria et al., 2015).

Statický headspace

Vzorkování při statické headspace technice je prováděno pomocí zařízení pro mikroextrakci na pevnou fázi (SPME). Jedná se o zařízení podobné duté jehle, které v jehle obsahuje výsuvné extrakční křemené vlákno, potažené tenkou vrstvou stacionární fáze, která je buď kapalným absorpčním filmem, nebo pevným adsorpčním sorbentem (Procházková, 2002). Vzorek je umístěn do malé nádoby a uzavřen víčkem se septem, v ideálním případě by se měl vzorek ještě zahřát na teplotu mezi 40-150°C, aby došlo k lepšímu uvolnění těkavých látek. Po dosažení rovnováhy v plynné fázi se propíchne septum vialky SPME jehlou a vysune se extrakční vlákno. Po uplynutí doby extrakce je vlákno zasunuto zpět do ochranné jehly. Doba extrakce je důležitá, protože při vysokých koncentracích těkavých látek v plynné fázi neodpovídá množství zachycené na stacionární fázi lineárně. Lineární závislost platí pouze pro nízké koncentrace analytů (Procházková, 2002). SPME jehla je pak vložena do inletu plynového chromatografu, kde dojde k termální desorpci zachycených těkavých látek. Výhodou této techniky je nedestruktivní rychlé vzorkování těkavých látek z plynné fáze nad vzorkem, extrakce analytů nevyžaduje použití rozpouštědla a extrahované látky jsou zachycené na vlákne a mohou být transportovány z místa vzorkování do laboratoře. Nevýhodou pro tyto techniky je, že se nehodí pro vzorkování stopových koncentrací, nicméně mohou sloužit k zakoncentrování těkavých látek obsažených v plynné fázi (Soria et al., 2015).

Dynamický headspace

Na rozdíl od statické headspace techniky, dynamické využívají proudění inertního plynu v okolí vzorku, kdy těkavé látky jsou unášeny inertním plynem na adsorpční filtr či do kryogenní pasti. Zachycené látky na adsorpčním filtru jsou následně vypláchnuty rozpouštědlem (Soria et al., 2015).

2.2.2 Plynová chromatografie

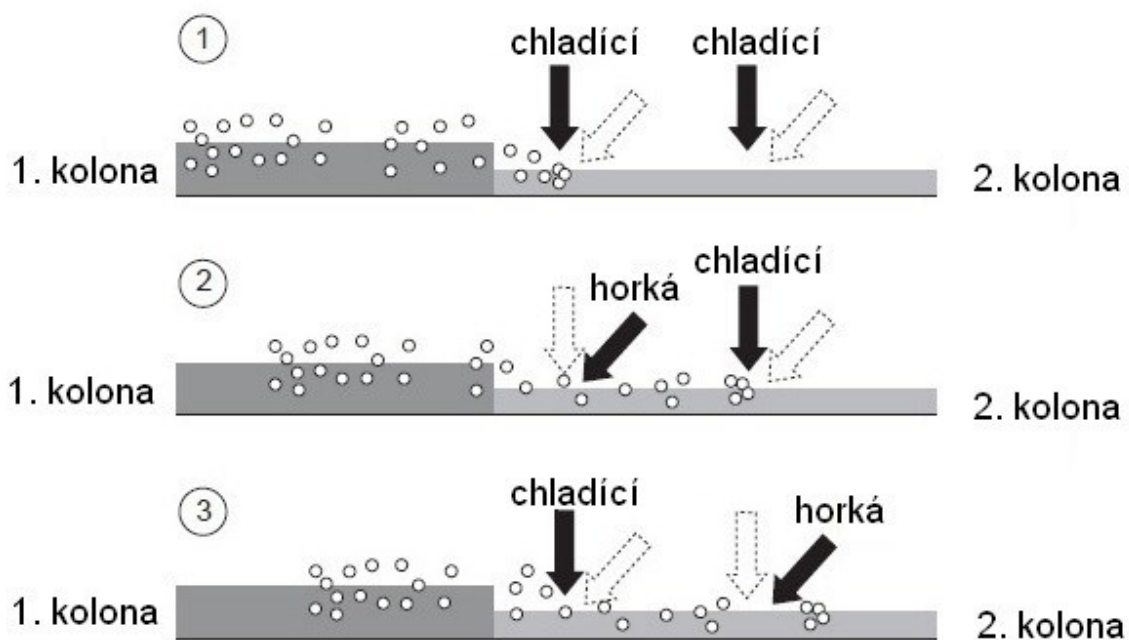
Plynová chromatografie patří mezi nejrozšířenější separační instrumentální techniky. Separace probíhá na principu rozdělení analytu mezi pevnou nebo kapalnou stacionární fází a plynou mobilní fází. Množství zachyceného analytu na stacionární fází závisí na jeho afinitě ke stacionární fází. Zachycení analytu na stacionární fází využívá mechanismů adsorpce anebo rozpouštění. Jako první procházejí detektorem látky, které mají nízkou afinitu ke stacionární fází. Měření systémem plynové chromatografie je možné pouze pro látky, které splňují podmínky na zplynění analytu v momentě nástřiku, a zároveň nesmí docházet k jejich termálnímu rozkladu při zvolené teplotě. Záznam z měření se nazývá chromatogram, který zachycuje velikost odezvy detektoru v závislosti na čase, doba průchodu analytu detektorem se nazývá retenční čas analytu, který poskytuje kvalitativní informaci o měřeném analytu. Kvantitativní informace lze získat z výpočtu výšky chromatografického píku analytu nebo jeho plochy. (Dettmer-Wilde a Engewald, 2014).

2.2.3 Komprehensivní dvoudimenzionální plynová chromatografie GC×GC

S rozvojem techniky a narůstajícím požadavkem po přesnější a podrobnější analýze komplexních vzorků byla vyvinuta analytická technika komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie. Tato technika umožňuje analýzu směsí těkavých organických látek, které mají podobnou či stejnou tenzi nasycených par. U látek s podobnou tenzí nasycených par dochází ke špatné vzájemné separaci (Barcelo, 2009). Komprehensivní dvoudimenzionální plynová chromatografie je separační technika, kde separace neprobíhá pouze jedním mechanismem, ale je použita ještě druhá doplňovací separace, která je založena na jiném separačním mechanismu (Giddings, 1990). V případě techniky GC×GC jsou v přístroji instalovány dvě kolony, které se liší svojí polaritou. První kolona má délku v rozmezí 30 – 60 metrů a obsahuje nepolární stacionární fází, separační mechanismus je založen na rozdílné teplotě varu analytů a tato kolona je nazývána kolonou primární. Druhá kolona obsahuje polárnější stacionární fází než kolona primární a je znatelně kratší, měří okolo 2 metrů, separace na ní probíhá na základě různé afinity analytů ke stacionární fází, tato kolona se nazývá kolonou sekundární. Každá z kolon je uložena ve své vlastní peci (Barcelo, 2009). Použití dvou kolon lišící se svojí polaritou umožňuje, že analyty neseparované na primární koloně mohou být rozděleny na koloně sekundární. Nicméně i přes své nesporné výhody se nestala GC×GC plynová

chromatografie široce rozšířenou technikou z důvodu určitých omezení při údržbě, vysokých pořizovacích nákladů spojených zejména s provozováním termální modulace a problematického rozhraní mezi systémem GC×GC a hmotnostním spektrometrem, které dále zvyšuje celkovou cenu provozu a pořízení zařízení (Poliak et al., 2008). Důležité parametry, které ovlivňují píkovou kapacitu systému jsou tok mobilní fáze, volba chromatografických kolon a nastavení teplotního programu pecí (Prebihalo et al., 2018).

Klíčovou součástí systému GC×GC je zařízení modulátor, které spojuje primární a sekundární kolonu. Jeho úlohou je zachytávat vycházející eluát z primární kolony a v opakovaných časových intervalech ho vstříkovat do kolony sekundární. Používané jsou tři modulační techniky a to modulace termální, ventilová a průtoková (Prebihalo et al., 2018). Na obrázku (Obrázek 2) je znázorněn čtyř-tryskový kryogenní modulátor a jeho schéma akcí. Modulátor obsahuje čtyři trysky, z toho dvě slouží pro chlazení a dvě pro ohřívání zachyceného eluátu. V první fázi přichází eluát z primární kolony k modulátoru, kde ho první chladicí tryska proudem kapalného dusíku zastaví před vstupem do modulátoru. V druhé fázi je eluát uvolněn proudem dusíku z první ohřívající trysky, který má teplotu pece a eluát vstupuje do modulátoru, kde je před vstupem do sekundární kolony opět zachycen proudem kapalného dusíku z druhé chladicí trysky, v tomto momentě je otevřený přístup z primární kolony do modulátoru a eluát vycházející z primární kolony se vněm začíná hromadit. Ve třetí fázi je spuštěna opět první chladicí tryska, která zamezí vstupu eluátu do modulátoru a druhá zahřívací tryska je spuštěna, což vede k uvolnění eluátu zadržovaného v modulátoru do sekundární kolony. Zachycení a stlačení eluátu v modulátoru vede k tvorbě ostrých píků, u kterých na krátké sekundární koloně nedochází k rozšiřování, což v důsledku vede ke zvýšení celkové píkové kapacity systému plynové chromatografie (Lee et al., 2001). Frekvence, při které pracuje modulátor, je mezi 0,1 – 1 Hz (Dallüge et al., 2003).



Obrázek 2 Schéma akcí zodpovědných za (1) zachycení vycházející eluátu z primární kolony (2) uvolnění a fokusaci eluátu v modulátoru (3) vstříknutí fokusovaného eluátu do sekundární kolony. Na obrázku je znázorněn čtyř-tryskový kryogenní modulátor využívající k chlazení kapalný dusík a ohřevu dusík vytemperovaný na teplotu pece (Focant et al., 2003)

2.2.4 Detektory pro GC×GC systém

Detektory jsou další důležitá část chromatografických systémů. V případě GC×GC techniky jsou kladeny vysoké nároky na frekvenci sběru dat detektoru. Tento požadavek je způsoben tím, že modulátor způsobí fokusaci píku, což vede ke vzniku úzkých píků, typicky 50 – 600 ms (Dallüge et al., 2003). Tyto úzké píky vyžadují detektory s malým vnitřním objemem a vysokou rychlostí sběru dat. Obecně je přijímáno, že pro správné vyhodnocení píku musí být naměřeno 6 – 10 bodů, které leží v tomto píku (Adahchour et al., 2005), proto by detektor měl pracovat v rozsahu frekvencí 20 – 100 Hz (Dallüge et al., 2003).

Plamenově ionizační detektor

Plamenově ionizační detektory (FID) byly první detektory, které splňovaly nároky na rychlost skenování pro GC×GC techniku, typicky v rozmezí 50 – 300 Hz. Výhodou tohoto detektoru bylo, že GC×GC chromatografie se původně využívala zejména pro

analýzu vzorků z petrochemického průmyslu, které mají vysoký obsah uhlíku a pro které je tento detektor velice citlivý (Cavagnino et al., 2003). FID detektor neposkytuje strukturní informaci, pro kvalitativní analýzu je zapotřebí změřit standardy analytů a porovnáním retenčních časů analytů a jejich standardů je možné určit, o jakou látku se jedná.

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr poskytuje strukturní informaci, proto je vhodný pro analýzu vzorků neznámého složení, pro identifikaci analytů není potřeba změření standardů, ale postačuje záznam naměřeného hmotnostního spektra a vypočtený retenční index. Pro systémy GC×GC se využívají hmotnostní spektrometry (TOF-MS), pracující na principu měření času, za který doletí fragmenty z iontového zdroje k detektoru. Parametry, které ovlivňují dobu, za kterou fragmenty dopadnou na detektor, jsou hmotnost fragmentu a jeho náboj. Tyto detektory jsou schopné nasnímat až 500 spekter za sekundu (Leclercq a Cramers, 1998). V průběhu sběru dat při měření jsou nasnímana kompletní spektra, což umožňuje dekonvoluci překrývajících se píků. Dekonvoluce znamená, že jsou v záznamu chromatogramu zobrazené pouze vybrané fragmenty, pak je tedy možné rozlišit i dva analyty, jejichž píky se překrývají. Pro úspěšnou dekonvoluci je zapotřebí, aby se eluční vrcholy píků dvou analytů lišily aspoň o krátký časový úsek a aby hmotnostní spektra těchto látek byla dostatečně rozdílná (Cochran, 2002).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Destilovaná voda	ÚOCHB AV ČR
Agar	ÚOCHB AV ČR
D-Maltóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
D-Glukóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
D-Xylóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
D-Fruktóza p.a.	Penta, ČR
D-Manóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
D-Sacharóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
D-Celulóza p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
Pepton z masa	Sigma-Aldrich, Německo
N,O-Bis(trimethylsilyl) acetamid $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Německo
<i>n</i> -hexan p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
<i>n</i> -alkany (C ₇ -C ₃₆)	Sigma-Aldrich, Německo
Kvasnicový extrakt	Fluka, Švýcarsko
1-bromnonan $\geq 98\%$	Fluka, Švýcarsko
kapalný dusík	Messer s.r.o., ČR
plynný dusík, argon	Messer s.r.o., ČR

Standard látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol ($\geq 99\%$) by poskytnut z University of Burgundy (Dijon, Francie) (Sillam-Dussès a Hanus; 2011)

3.2 Přístroje a vybavení

LECO GC×GC-TOFMS

V této diplomové práci byl používán systém LECO Pegasus 4D (LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) s plynovým chromatografem (Agilent Technologies 6890N) se sekundární pecí, vybavený čtyř-tryskovým kryomodulátorem na kapalný dusík, detektorem TOFMS Pegasus a automatickým dávkovačem (Agilent Technologies 7683). Dvourozměrné chromatografické dělení bylo realizováno v první dimenzi na nepolární koloně Rxi-5Sil MS (Restek Corporation, Bellefonte, Pensylvánie, USA) s rozměry $30\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ tloušťka filmu a v druhé dimenzi na středně polární koloně Rxi-17Sil (Restek Corporation, Bellefonte, Pensylvánie, USA) o rozměrech $1,19\text{ m} \times 150\text{ }\mu\text{m} \times 0,15\text{ }\mu\text{m}$ tloušťka filmu.

Dále byly používány tyto přístroje:

Vertikální laminární flow box	Steril Gemini cabinet, Angelantoni Life Science
Centrifuga	Allegra X-15R, Beckman Coulter
Lyofilizátor	Virtis sentry 2.0, SP Scientific
Inkubátor	NB-205, N-Biotek
Miligramové analytické váhy	XS 105 Dual Range, Mettler Toledo
Souprava pro vakuovou filtraci	

3.3 Pomůcky

Skleněné Petriho misky, skleněné Pasteurovy pipety, 500 μl Hamiltonova stříkačka, 10 μl Hamiltonova stříkačka, filtry pro vakuovou filtraci MN GF-6 o průměru 55 mm, 2ml skleněné vialky s teflonovým víčkem, sterilizované laboratorní nástroje

3.4 Software

LECO ChromaTOF™ (LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA) slouží k vyhodnocování a vizualizaci dat získaných metodou GC×GC-TOFMS

Canoco pro Windows 4.5.2 (Biometris, Plant Research International, Wageningen, Nizozemsko) byl použit pro Analýzu hlavních komponent naměřených dat

CanocoDraw Integrovaný nástroj programu Canoco pro vizualizaci zpracovaných dat statistickou metodou PCA

3.5 Biologický materiál

Zdrojové kmeny houby *G. trabeum* pro kultivaci experimentálních vzorků byly získány pracovištěm Chemie přírodních látek z externích spolupracujících výzkumných ústavů. Získány byly dvě nezávisle izolované zdrojové kultury hub *G. trabeum*.

Kmen Březnice

Tento kmen byl poskytnutý institucí Výzkumný a vývojový ústav dřevařský, Praha, státní podnik. Identifikační číslo kultury bylo MycoBank ATCC11539. Získáno bylo dvakrát rozpěstované sekundární mycelium hub *G. trabeum* v urinálních nádobách na agar-maltózovém médiu. Po přijetí zdrojových kultur byla provedena kultivace hub *G. trabeum* na Petriho miskách obsahující agar-maltózové médium.

Kmen Brno

Tento kmen byl poskytnutý institucí Lesnická a dřevařská fakulta Mendelovy univerzity v Brně. Kultura byla izolována doc. RNDr. Michalem Tomšovským, Ph.D. Získány byly dvě sekundární mycelia v Petriho miskách kultivovaných na agar-maltózovém médiu.

Všechny získané zdrojové kultury byly skladovány ve sterilních termoboxech za konstantní teploty 25 °C a 60 - 70% vzdušné vlhkosti.

3.6 Metodika a pracovní postupy

3.6.1 Druhy sacharidů obsažené v živných substrátech

Bylo zvoleno použít 6 různých sacharidů, které měly sloužit jako zdroj uhlíku pro houbu *G. trabeum* kultivovanou na pevném či kapalném médiu. Použité sacharidy byly následující

- Monosacharidy Fruktóza
 Xylóza
 Manóza
- Disacharidy Sacharóza
 Maltóza
- Polysacharid Celulóza

3.6.2 Kultivace houby *G. trabeum* na pevném médiu

Inokulace Petriho misek obsahující agar - celulózové médium byla provedena pro oba získané kmeny houby *G. trabeum* z externích pracovišť v Brně a Březnici. Před přípravou samotného roztoku byla provedena v autoklávu sterilizace skleněných Petriho misek, po sterilizaci byly Petriho misky uloženy ve sterilním prostředí laminárního boxu, aby nedošlo ke kontaminaci z vnějšího prostředí. Vodný roztok pro přípravu pevného živného média byl připraven tak, aby obsahoval následující hmotnostní koncentrace složek

- 40 g·l⁻¹ sacharidu celulózy
- 20 g·l⁻¹ agaru
- 5 g·l⁻¹ peptonu z masa
- 5 g·l⁻¹ kvasnicového extraktu
- 5 g·l⁻¹ glukózy

Roztok byl připraven do skleněné širokohrdlé láhve, po navážení složek byla láhev doplněna vodou a roztok byl promíchán. Následně byla láhev vložena do autoklávu, kde při zvýšené teplotě a tlaku došlo ke sterilizaci roztoku. Poté byl roztok přenesen do sterilního prostředí laminárního boxu.

Takto připravený roztok bylo nutné před jeho vychladnutím rozlít do předem připravených sterilizovaných Petriho misek, množství nalitého roztoku bylo takové, aby vytvořil tenkou vrstvu na dně Petriho misky, poté byly Petriho misky s rozlitým horkým roztokem ponechány vychladnout až do ztuhnutí roztoku. Po ztuhnutí roztoku mohla být provedena inokulace zdrojovými kulturami. Z Petriho misek obsahujících zdrojové kultury bylo setřeno sterilní inokulační kličkou malé množství kolonií houby *G. trabeum*

a rozprostřeno vlnkovitým pohybem po povrchu ztuhlého kultivačního média. Po každém rozestření byla inokulační klička sterilizována opláchnutím v ethanolu a vyžihání nad kahanem.

Inokulované Petriho misky byly uloženy v termoboxu, kde při konstantní teplotě 25°C a 60 – 70% vzdušné vlhkosti probíhala po dobu 50 dní kultivace mycelií *G. trabeum*. Po uběhnutí jednoho týdne od inokulace byly Petriho misky otočeny dnem vzhůru, aby nedocházelo na dně k ukládání vody ze vzdušné vlhkosti.

3.6.3 Odběr vzorků houby *G. trabeum* kultivovaných na pevném médiu

Po uplynutí doby pro dostatečný růst mycelií houby *G. trabeum*, byly kolonie vyseparovány sterilními laboratorními nástroji do 50 ml širokohrdlé zábrusové baňky s kulatým dnem a bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla hexanu. Extrakce do rozpouštědla byla prováděna za stálého míchání na třepačce po dobu 2 dní. Po uplynutí extrakční doby, byl extrakt vyjmut skleněnou Pasteurovou pipetou a přelit do 50 ml odpařovací baňky. Následně byl nadbytek extrakčního činidla odpařen při sníženém tlaku na rotační odparce. Po odpaření přebytku extrakčního činidla, bylo do odpařovací baňky přidáno 1,5 ml hexanu a roztok byl nechán 30 minut ustálit. Po uplynutí 30 minut byly Pasteurovou pipetou z roztoku odebrány dva alikvotní podíly extraktu a uloženy ve 2 ml skleněných vialkách. Tyto extrakty sloužily pro zjištění, zdali získané kmeny houby *G. trabeum*, kultivované na Petriho miskách produkují látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol. Všechny připravené extrakty byly skladovány v chladicím boxu při teplotě -18°C.

3.6.4 Kultivace houby *G. trabeum* v kapalném médiu

Inokulace vodných roztoků byla provedena ze zdrojových kultur houby *G. trabeum* poskytnutých z instituce Lesnická a dřevařská fakulta Mendelovy univerzity v Brně.

Bylo použito 5 druhů sacharidu pro přípravu živných vodných roztoků. Použité monosacharidy byly xylóza, fruktóza a manóza. Použité disacharidy byly sacharóza a maltóza. Každý roztok obsahoval následující hmotnostní koncentrace složek

- 20 g·l⁻¹ zvoleného sacharidu
- 5 g·l⁻¹ peptonu z masa
- 5 g·l⁻¹ kvasnicového extraktu
- 5 g·l⁻¹ glukózy

Roztoky byly připravovány do 250 ml Erlenmeyerových baněk o celkovém obsahu vody 100 ml. Po přípravě roztoků bylo hrdlo baněk uzavřeno alobalem a baňky byly vloženy na 15 minut do autoklávu, kde při zvýšené teplotě a tlaku došlo ke sterilizaci živných roztoků.

Po sterilizaci byly baňky vyjmuty z autoklávu a vloženy do laminárního boxu, kde po vychladnutí na pokojovou teplotu následně proběhla jejich inokulace houbou *G. trabeum* kultivovanou na pevném médiu v Petriho misce. Inokulace byla prováděna ve sterilním prostředí laminárního boxu, aby nedošlo ke kontaminaci sterilizovaných roztoků. Z Petriho misky bylo sterilizovanou inokulační kličkou setřeno malé množství kolonií houby *G. trabeum* a vloženo do připravených živných roztoků, po každém setření Petriho misky byla inokulační klička opláchnuta v ethanolu a vyžíhána nad kahanem. Po inokulaci byla hrdla všech baněk opět překryta alobalem.

Po procesu inokulace byly roztoky vloženy do inkubátoru, kde po dobu 21 dní probíhala kultivace houby *G. trabeum* v živných vodných roztocích. Podmínky kultivace v inkubátoru byly teplota 30°C a stálé míchání 150 otáček za minutu.

3.6.5 Odběr vzorků houby *G. trabeum* kultivovaných v kapalném médiu

Inkubační doba byla zvolena na 21 dní, kdy v roztocích byla přítomna již značná suspenze vniklých kolonií houby *G. trabeum*. Roztoky byly vyjmuty z inkubátoru a zfiltrovány pomocí vakuové filtrace. Kolonie se usazovaly na filtračním papíru a byly odděleny od roztoku. Vzniklý filtrační koláč ze suspenze kolonií byl promýván 500 ml destilované vody, aby došlo k odstranění ve vodě rozpustných látek, které by mohly způsobovat nežádoucí interference při měření. Po promytí filtračního koláče byl filtrační papír sejmут z filtrační aparatury a vložen do Petriho misky pro následné vzorkování do 2 ml skleněných vialek.

Filtrační koláč vzniklý z filtrace suspenze kolonií houby *G. trabeum* byl sterilizovanými laboratorními nástroji rozdělen na menší díly, z každého filtračního koláče byly odebrány dva duplikátní vzorky o hmotnosti v rozsahu 50 – 100 mg a vloženy do předem zvážených suchých 2 ml skleněných vialek. Do každé vialky obsahující odebrané kolonie *G. trabeum* bylo následně přidáno 1200 µl extrakčního činidla hexanu, extrakce probíhala za stálého míchání vialek na třepače, po dobu 1 dne.

Zbýlý filtrační koláč byl vložen do 50 ml odpařovací baňky a extrahován do hexanu za stálého míchání na třepačce, po dobu 2 dnů. Následně byl tento extrakt zpracován stejně jako při vzorkování houby *G. trabeum* kultivované na pevném mediu. Tyto extrakty sloužily pro zjištění, zdali získané kmeny houby *G. trabeum*, kultivované v živných roztocích produkují látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol.

Po uplynutí doby extrakce byly 2 ml vialky odstředěny na centrifuze, aby došlo k oddělení suspenze kolonií od roztoku, následně bylo z každé vialky vyjmuto 800 μ l hexanového extraktu a nalito do nové 2 ml vialky. K takto připraveným 800 μ l hexanového extraktu byl přidán 1 μ l vnitřního standardu 1-bromnonanu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Takto byly připraveny všechny vzorky houby *G. trabeum* kultivované v živných roztocích obsahující rozdílné druhy sacharidů. Všechny vzorky filtračních koláčů byly odebrány v duplikátech.

Původní vialky obsahující kolonie *G. trabeum* a zbytky extrakčního činidla byly dány do digestoře, kde byly proudem argonu odstraněny zbytky extrakčního činidla. Po odstranění zbytků extrakčního činidla byly vialky obsahující kolonie *G. trabeum* uloženy do mrazáku, kde při teplotě -80°C došlo k zmrznutí zbylé vody.

Po několika dnech v mrazáku při teplotě -80°C byly vialky obsahující zmrzlé kolonie vyjmuty ven a vloženy do lyofilizátoru, kde došlo k sublimaci zbytků vody zachycené ve filtračním koláči po vakuové filtraci. Tímto způsobem byla připravena sušina *G. trabeum* v předem zvážených skleněných vialkách.

Z rozdílu hmotnosti vialek obsahující sušinu a vialek prázdných byla vypočtena hmotnost vzorkovaných kolonií houby *G. trabeum*, z kterých byla provedena extrakce těkavých organických látek do hexanu. Takto vypočtená hmotnost sušiny sloužila k vyhodnocení semikvantitativních změn obsahu těkavých organických látek v závislosti na druhu sacharidu obsaženém v živných roztocích, ve kterých probíhala kultivace houby *G. trabeum*. Všechny připravené extrakty byly skladovány v mrazícím boxu při teplotě -18°C.

3.7 Analýza vzorků systémem GC×GC-TOFMS

3.7.1 Optimalizované podmínky měření systémem GC×GC-TOFMS

Vzorky extraktů kolonií houby *G. trabeum* v rozpouštědle hexanu byly analyzovány systémem GC×GC-TOFMS LECO Pegasus 4D. Dávkování vzorků bylo prováděno automaticky o objemu 1 μl , měření bylo prováděno v režimu splitless. Použitá mobilní fáze byla plyn helium, její průtok systémem byl 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Instalované separační kolony v měřicím systému byly následující.

- Předkolona ZB-5MS o délce 2 m; vnějším průměru 250 μm ; tloušťka ukotvené nízko polární stacionární fáze byla 0,25 μm .
- Primární kolona Rxi-5Sil MS o délce 30 m; vnějším průměru 250 μm ; tloušťka ukotvené nízko polární stacionární fáze byla 0,25 μm .
- Sekundární kolona Rxi-17Sil MS o délce 1,19 m; vnější průměr 150 μm ; tloušťka ukotvené středně polární stacionární fáze 0,15 μm .
- Kolona použitá v rozhraní (transferline) mezi systémem plynové chromatografie a hmotnostním spektrometrem, byla Rxi-17Sil MS o délce 0,21 m; vnější průměr 150 μm ; tloušťka ukotvené středně polární stacionární byla fáze 0,15 μm .

Systém plynové chromatografie byl nastaven pro měření v režimu teplotního gradientu. Teplota inletu byla 250°C po dobu celého měření. Teplotní program primární kolony byl následující, počáteční teplota primární kolony 50°C po dobu 1 minuty, poté následoval ohřev s teplotním gradientem 3°C·min⁻¹ v rozmezí teplot 50°C - 200°C, po dosažení teploty 200°C okamžitě pokračoval ohřev primární kolony s teplotním gradientem 8°C·min⁻¹ v rozsahu teplot 200°C - 320°C, po dosažení teploty 320°C zůstala teplota primární kolony konstantní po dobu 10 minut. Teplotní program sekundární kolony byl o 10°C vyšší než teplotní program primární kolony. Teplotní program modulátoru byl o 20°C vyšší než teplotní program primární kolony. Modulátor pracoval s modulační periodou 5 sekund, doba horkého pulzu 1,5 sekundy, doba chlazení mezi horkou a chladnou fází modulátoru 1 sekunda. Teplota rozhraní mezi plynovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem byla po celou dobu měření konstantních 260°C. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu elektronové ionizace, teplota iontového zdroje byla 220°C, ionizační elektrony měly energii 70 eV. Frekvence snímání

spekter byla 50 Hz v rozsahu hmot 29 – 600 Da, použité napětí na detektoru bylo 1500 V.

3.7.2 Měření vzorků systémem GC×GC-TOFMS

3.7.2.1 Měření vzorků připravených pro semikvantitativní analýzu

Hexanové extrakty připravené z odebraných vzorků kolonií houby *G. trabeum*, kultivovaných ve vodných roztocích, o objemu 800 µl v 2 ml skleněných vialkách obsahující přidáný 1 µl vnitřního standardu 1-bromnonanu byly v digestoři proudem argonu zakoncentrovány na zhruba poloviční objem. Automatickým dávkovačem byl nastříknut 1 µl extraktu do měřicího systému komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie. Všechny extrakty kolonií houby *G. trabeum* kultivované v kapalném médiu byly měřeny v duplikátech, každé měření extraktu bylo provedeno dvakrát.

3.7.2.2 Měření produkce látky dodekatrienolu houbou *G. trabeum*

Měření produkce látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol (dále zkráceně jako dodekatrienol) houbou *G. trabeum* bylo provedeno pro připravené hexanové extrakty ze vzorků kolonií kultivovaných na pevném i v kapalném médiu. Extrakty byly odebrány v alikvotních podílech, z každé extrakce byly připraveny dva alikvotní podíly extraktu. Pro zjištění retenčního času a hmotnostního spektra látky dodekatrienolu byl změřen její čistý standard. Extrakty připravené ve 2 ml skleněných vialkách byly zakoncentrovány odpařením rozpouštědla hexanu proudem dusíku v digestoři, extrakty byly zakoncentrovány z objemu 1 ml zhruba na objem 50 µl. Z takto připravených vzorků byl odebrán 1 µl extraktu pro měření systémem komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie.

Po provedení těchto měření bylo k 50 µl vzorku přidáno 30 µl silylačního činidla *N*, *O*-bis(trimethylsilyl) acetamidu [BSA] pro provedení derivatizace (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu, roztok byl po smíchání ponechán 20 minut reagovat. Zároveň byla provedena i silylace standardu dodekatrienolu. Z takto připravených vzorků byl odebrán 1 µl roztoku pro měření systémem komprehenzivní dvoudimenzionální plynové chromatografie. Z měření silylovaného standardu dodekatrienolu byl zjištěn retenční čas a hmotnostní spektrum vzniklého produktu derivatizační reakce.

3.8 Zpracování naměřených dat

Zpracování dat bylo prováděno komerčním softwarem LECO ChromaTOF™ dodávaným k měřicímu systému GC×GC-TOFMS LECO Pegasus 4D. Naměřená data byla softwarově interpretována ve formě 2D chromatogramů. Porovnání naměřených chromatogramů bylo provedeno softwarovou funkcí statistického srovnání, kdy na základě retenčních časů a hmotnostních spekter byly automaticky přiřazeny a vypočteny plochy píků jednotlivých analytů přítomných v měřených vzorcích. Výpočet ploch píků analytů probíhal v režimu dekonvoluce, integrace každého analytu byla provedena pro záznam intenzity signálu charakteristického fragmentu m/z , náležící analytu, dopadajícího na detektor. Tímto způsobem byly vypočteny a zaznamenány plochy všech naměřených analytů.

Pro identifikaci jednotlivých analytů byl použit výpočet retenčních indexů dle definice Van den Dool a Kratz (rovnice 1), definovaných pro systém plynové chromatografie pracující v režimu měření s teplotním gradientem (Van Den Dool a Kratz, 1963). Bylo provedeno měření směsi standardů n -alkanů C_7 - C_{36} , za použití výše zmíněného teplotního programu. Z retenčních časů analytů a standardů n -alkanů byly vypočteny retenční indexy (RI) příslušející měřeným analytům.

$$RI = 100 \left(\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) + 100n \quad (\text{rovnice 1})$$

kde n je počet atomů uhlíku na nejbližším nižším n -alkanu, t_n resp. t_{n+1} je retenční čas nejbližšího nižšího resp. vyššího n -alkanu, t_x je retenční čas analytu

Identifikace analytů byla provedena porovnáním hmotnostních spekter a vypočtených retenčních indexů s údaji publikovaných ve specializované elektronické databázi NIST (Wallace, 2018a; Wallace, 2018b) a v dostupné specializované literatuře (Adams, 2009; Joulain a König, 1998)

3.9 Vyhodnocení a statistická analýza naměřených dat

Semikvantitativní a kvalitativní analýza produkce těkavých organických látek byla provedena pro hexanové extrakty kolonií houby *G. trabeum* kultivované ve vodných živných roztocích. Z každého vzorku byly připraveny dva extrakty pro měření v duplikátech. Všechny vzorky extraktů z kolonií byly připraveny stejným způsobem,

k 800 µl připraveného hexanového extraktu byl přidán 1 µl vnitřního standardu 1-bromnonanu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Zároveň byla zvážena hmotnost sušiny kolonií, ze kterých byly extrakty připraveny. Z naměřených ploch analytů byla vypočtena relativní plocha píku analytu $A_{\text{normalizovaná}}$, tedy podíl plochy píku analytu A_{analytu} k ploše píku přidávaného vnitřního standardu, $A_{\text{vitř. std.}}$.

$$A_{\text{normalizovaná}} = \frac{A_{\text{analytu}}}{A_{\text{vitř. std.}}} \quad (\text{rovnice 2})$$

Následným vydělením normalizované plochy píku analytu $A_{\text{normalizovaná}}$, změřenou hmotností sušiny v gramech byla vypočtena měrná normalizovaná plocha analytu, $A_{\text{hmotnostní}}$, vztažená na jednotku navážky sušiny, $m_{\text{sušiny}}$

$$A_{\text{hmotnostní}} = \frac{A_{\text{normalizovaná}}}{m_{\text{sušiny}}} \quad (\text{rovnice 3})$$

Každý extrakt a jeho duplikát, které byly připraveny z kolonií houby *G. trabeum*, kultivovaných v roztocích s rozdílným přítomným druhem sacharidu v kultivačním roztoku, byly změřeny dvakrát, z těchto čtyř měření byl vypočten průměr a směrodatná odchylka obsahu organických těkavých látek. Výsledky těchto měření byly zpracovány do tabulky č. 1. Naměřené výsledky byly dále interpretovány ve formě grafů a členěny dle funkčních skupin analytů.

Ke statistickému vyhodnocení rozdílů naměřených dat produkce těkavých organických látek houbou *G. trabeum*, kultivované ve vodných prostředích obsahující různé druhy sacharidů, byla použita statistická metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Vyhodnocení bylo provedeno pro data vypočtená v absolutním množství tak, jak jsou uvedena v tabulce (Tabulka 1). Z důvodu kritérií pro provedení PCA analýzy, byla ke každé naměřené hodnotě analytů v tabulce připočtena hodnota 0,05 mA·s·g⁻¹, aby analyty nenaměřené v některých vzorcích nenabývaly nulových hodnot. Připočtená hodnota odpovídala nejnižší naměřené hodnotě na systému GC×GC-TOFMS. PCA byla provedena ve statistickém softwaru Canoco, a vizualizace byla zpracována softwarem CanocoDraw. Všechna vstupní data byla před analýzou PCA centrována a standardizována.

Cílem vícerozměrné statistické metody PCA je zjednodušit popis skupiny vzájemně lineárně závislých čili korelovaných znaků. Původní znaky jsou metodou lineární

transformace přepočteny na nové, nekorelované proměnné, nazvané hlavní komponenty. Základní charakteristikou každé hlavní komponenty je její rozptyl, hlavní komponenty jsou seřazeny dle důležitosti, tj. dle klesajícího rozptylu. První hlavní komponenta vysvětluje největší variabilitu původních dat, druhá druhou největší a tak dále. Analýza hlavních komponent slouží ke snížení dimenze úlohy čili redukce počtu znaků bez velké ztráty informace, a to pouze s použitím několika hlavních komponent (Meloun a Militký, 2004).

4 VÝSLEDKY

4.1 Semikvantitativní analýza

Celkově bylo detekováno 71 organických těkavých látek (Tabulka 1) produkovaných houbou *G. trabeum* kultivovanou ve vodných roztocích. Jejich rozdělení proběhlo na základě příslušnosti látky k funkční skupině. Ve vzorcích bylo identifikováno 6 různých skupin látek, bylo to 5 alkoholů, 2 ketony, 6 aldehydů, 8 karboxylových kyselin, 24 esterů různých druhů kyselin a 26 seskviterpenů.

Další rozdělení proběhlo na základě procentuálního zastoupení z celkového množství naměřených analytů v rámci měřeného vzorku. Látky, které měli zastoupení větší jak 8% z celkového množství, byly označeny za hlavní komponenty vzorku, látky s nižším obsahem jak 8% ale větším jak 1% byly označeny za minoritní komponenty a zbývající látky s nižším obsahem než 1% byly označeny za stopové množství. Celková suma hmotnostních ploch všech naměřených organických těkavých látek byla pro vzorky obsahující sacharid manózu $202,2 \pm 17,2 \text{ mA}\cdot\text{s}\cdot\text{g}^{-1}$, fruktózu $599,6 \pm 65,8 \text{ mA}\cdot\text{s}\cdot\text{g}^{-1}$, sacharózu $500,8 \pm 33,4 \text{ mA}\cdot\text{s}\cdot\text{g}^{-1}$, xylózu $312,3 \pm 41,4 \text{ mA}\cdot\text{s}\cdot\text{g}^{-1}$ a manózu $464,6 \pm 23,1 \text{ mA}\cdot\text{s}\cdot\text{g}^{-1}$, hodnoty jsou uvedeny ve formátu průměr \pm SD.

Naměřená data byla interpretována ve formě dvou grafů pro každou funkční skupinu. První graf představoval procentuální zastoupení analytů náležící příslušné funkční skupině v rámci celkového množství těkavých organických látek naměřených ve vzorku obsahující příslušný sacharid. Druhý graf představoval procentuální porovnání množství produkovaných těkavých organických látek v rámci funkční skupiny napříč všemi vzorky, tento graf sloužil k porovnání celkové produkce těkavých organických látek příslušící dané funkční skupině mezi měřenými vzorky.

U osmi analytů byla určena prostorová orientace geometrické izomerie na základě srovnání naměřených retenčních indexů s tabelovanými. Tyto látky byly (*E*)-3-fenylprop-2-en-1-ol (5), (5*Z*)-6,10-dimethyl-5,9-undekadien-2-on (73), (2*E*)-okt-2-enal (2), (2*E*)-3-fenylprop-2-en-1-al (10), (2*E*,4*Z*)-deka-2,4-dienal (11), (2*E*,4*Z*)-deka-2,4-dienal (71), methylester kyseliny (2*E*)-3-fenylprop-2-enové (30) a ethylester kyseliny (2*E*)-3-fenylprop-2-enové (32).

Tabulka 1 (průměr vypočtených hmotnostních ploch \pm SD) 71 chemických látek naměřených metodou GC \times GC-TOFMS ve vzorcích houby *Gloeophyllum trabeum* kultivovaných ve vodných roztocích obsahující různé sacharidy. RI = vypočtený retenční index, RČ = retenční čas analytu v sekundách uvedený ve formátu (retenční čas na primární koloně; retenční čas na sekundární koloně)

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
Alkoholy								
1	okt-1-en-3-ol	976	700; 2,4	7,72 \pm 0,94	83,8 \pm 14,3	5,11 \pm 0,80	2,28 \pm 0,28	8,41 \pm 0,27
2	oktan-1-ol	1068	935; 2,7	-	0,41 \pm 0,04	-	0,86 \pm 0,09	0,43 \pm 0,09
3	2-fenylethan-1-ol	1107	1040; 4,5	27,6 \pm 2,3	13,8 \pm 1,5	8,15 \pm 0,58	37,1 \pm 4,5	107,1 \pm 8,1
4	3-fenylpropan-1-ol	1226	1360; 4,7	22,1 \pm 4,6	-	-	40,9 \pm 11,2	147,7 \pm 4,6
5	(E)-3-fenylprop-2-en-1-ol	1305	1575; 0,2	2,47 \pm 0,64	-	-	-	3,30 \pm 0,26
Ketony								
6	oktan-3-on	980	710; 2,7	1,52 \pm 0,36	1,04 \pm 0,18	-	0,18 \pm 0,04	0,70 \pm 0,05
73	(5Z)-6,10-dimethyl-5,9-undekadien-2-on	1442	1920; 3,5	-	0,26 \pm 0,04	0,25 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03	0,14 \pm 0,01
Aldehydy								
7	(E)-okt-2-enal	1054	900; 3,1	-	-	0,10 \pm 0,01	0,11 \pm 0,03	-
8	nonan-1-al	1101	1025; 2,9	0,17 \pm 0,04	-	0,35 \pm 0,03	0,21 \pm 0,06	-
9	3-fenylpropan-1-al	1159	1180; 4,9	0,12 \pm 0,03	-	-	0,54 \pm 0,10	1,03 \pm 0,11
10	(E)-3-fenylprop-2-en-1-al	1270	1480; 0,5	4,91 \pm 0,87	-	-	6,51 \pm 0,44	36,9 \pm 1,0

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
11	(2E,4Z)-dekadienal	1291	1535; 3,5	0,19 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,24 ± 0,02	0,18 ± 0,01
71	(2E,4E)-dekadienal	1313	1595; 3,6	0,33 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,66 ± 0,12	0,62 ± 0,16	0,19 ± 0,03
Karboxylové kyseliny								
12	hexanová kyselina	968	680; 2,5	0,97 ± 0,32	0,24 ± 0,03	1,28 ± 0,26	1,18 ± 0,13	0,14 ± 0,02
13	oktanová kyselina	1163	1190; 2,9	0,53 ± 0,09	-	0,50 ± 0,05	3,64 ± 0,48	0,25 ± 0,02
14	nonanová kyselina	1261	1455; 2,9	0,41 ± 0,09	0,10 ± 0,01	0,17 ± 0,05	1,12 ± 0,17	0,52 ± 0,01
15	dekanová kyselina	1358	1710; 3,0	0,29 ± 0,08	-	0,17 ± 0,04	18,7 ± 2,7	0,12 ± 0,02
16	dodekanová kys.	1553	2190; 3,0	0,29 ± 0,08	-	0,26 ± 0,06	0,92 ± 0,21	0,17 ± 0,02
17	tetradekanová kys.	1756	2625; 3,1	0,70 ± 0,03	-	-	0,51 ± 0,11	4,54 ± 0,44
18	palmitová kys.	1962	3035; 3,3	ano	ne	ne	ano	ano
19	linolová kyselina	2133	3285; 2,7	ano	ano	ano	ano	ano
Estery								
20	ethylester kys. hexanové	1000	745; 2,5	0,40 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,21 ± 0,03	1,13 ± 0,23	0,90 ± 0,05
21	ethylester kys. heptanové	1094	1005; 2,7	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,59 ± 0,14	0,50 ± 0,04
22	methylester kys. oktanové	1120	1075; 2,8	-	-	-	1,84 ± 0,46	0,05 ± 0,01
23	ethylester kys. benzoové	1169	1205; 4,1	0,62 ± 0,05	28,3 ± 3,7	5,20 ± 0,52	1,10 ± 0,18	0,90 ± 0,11

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
24	methylester kys. fenyloctové	1172	1215; 4,7	1,37 ± 0,09	21,7 ± 2,8	4,66 ± 0,26	1,97 ± 0,55	0,90 ± 0,06
25	ethylester kys. oktanové	1193	1270; 2,8	0,79 ± 0,14	0,17 ± 0,02	0,50 ± 0,04	13,6 ± 2,5	1,60 ± 0,16
26	ethylester kys. nonanové	1290	1535; 2,8	0,07 ± 0,01	0,33 ± 0,02	2,11 ± 0,22	0,41 ± 0,05	0,21 ± 0,02
27	methylester kys. dekanová	1319	1610; 2,9	-	-	-	1,97 ± 0,41	0,11 ± 0,01
28	ethylester kys. 3-fenylpropanové	1343	1670; 4,3	25,4 ± 2,3	18,1 ± 1,5	21,8 ± 2,6	18,9 ± 1,2	11,6 ± 1,1
29	3-fenylpropylester kys. octové	1362	1725; 4,4	1,54 ± 0,08	-	-	2,73 ± 0,07	13,47 ± 1,01
30	methylester kys. (2E)-3-fenylprop-2- enové	1378	1765; 4,9	19,5 ± 2,4	10,9 ± 0,8	46,5 ± 5,0	27,8 ± 9,9	5,3 ± 0,63
31	ethylester kys. dekanové	1386	1780; 2,9	0,56 ± 0,09	0,32 ± 0,04	1,24 ± 0,16	24,0 ± 6,0	1,79 ± 0,04
32	ethylester kys. (2E)- 3-fenylprop-2-enové	1462	1970; 4,7	11,3 ± 0,9	0,24 ± 0,03	13,8 ± 2,3	31,8 ± 2,9	10,6 ± 0,8
33	methylester kys. 5-fenylpentanové	1557	2195; 4,4	2,43 ± 0,07	1,40 ± 0,31	2,24 ± 0,36	0,49 ± 0,02	0,95 ± 0,08

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
34	ethylester kys. dodekanové	1589	2265; 2,9	0,04 ± 0,01	1,07 ± 0,13	0,84 ± 0,07	0,26 ± 0,07	0,54 ± 0,03
35	ethylester kys. tridekanové	1691	2490; 2,9	-	1,64 ± 0,25	1,53 ± 0,14	-	0,06 ± 0,01
36	ethylester kys. tetradekanové	1790	2685; 2,9	0,46 ± 0,05	50,0 ± 6,3	28,3 ± 2,5	0,14 ± 0,05	12,2 ± 0,2
37	ethylester kys. pentadekanové	1887	2895; 2,9	-	-	-	0,14 ± 0,02	-
38	methylester kys. palmitové	1921	2960; 3,0	0,13 ± 0,03	5,68 ± 1,33	0,43 ± 0,05	0,08 ± 0,03	0,56 ± 0,01
39	ethylester kys. palmitové	1968	3045; 3,1	0,55 ± 0,07	7,79 ± 0,55	12,4 ± 2,4	-	-
40	methylester kys. linolové	2062	3195; 2,6	1,14 ± 0,10	17,9 ± 1,4	29,7 ± 4,3	0,09 ± 0,01	2,69 ± 0,04
41	ethylester kys. heptanové	2089	3235; 2,3	0,49 ± 0,06	179,8 ± 26,2	146,8 ± 14,0	0,04 ± 0,01	2,93 ± 0,61
42	ethylester kys. linolové	2152	3305; 2,4	9,48 ± 1,09	4,34 ± 0,76	7,89 ± 1,28	2,18 ± 0,17	1,00 ± 0,07
70	ethylester kys. fenyloctové	1238	1395; 4,5	3,24 ± 0,54	1,12 ± 0,18	0,90 ± 0,07	0,35 ± 0,05	23,2 ± 1,8

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
Seskviterpeny								
43	seskviterpen 1	1266	1470; 2,4	0,39 ± 0,11	0,34 ± 0,04	0,85 ± 0,05	0,79 ± 0,10	0,53 ± 0,05
44	seskviterpen 2	1272	1485; 2,4	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,76 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,18 ± 0,02
45	seskviterpen 3	1296	1550; 2,5	0,80 ± 0,26	0,12 ± 0,02	0,59 ± 0,05	4,01 ± 0,58	1,79 ± 0,18
46	seskviterpen 4	1307	1580; 2,6	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,02	1,08 ± 0,06	0,46 ± 0,08	0,25 ± 0,01
47	seskviterpen 5	1315	1600; 2,6	1,41 ± 0,45	0,18 ± 0,03	0,68 ± 0,07	7,37 ± 1,24	3,13 ± 0,14
48	seskviterpen 6	1339	1660; 2,7	2,59 ± 0,89	2,09 ± 0,17	13,1 ± 1,2	9,32 ± 1,46	4,26 ± 0,05
49	seskviterpen 7	1343	1670; 2,7	0,73 ± 0,22	0,62 ± 0,05	4,22 ± 0,58	2,13 ± 0,55	1,10 ± 0,10
51	seskviterpen 8	1358	1710; 2,7	0,16 ± 0,05	-	0,34 ± 0,03	0,54 ± 0,06	0,29 ± 0,03
52	longicyclen	1374	1750; 2,8	0,23 ± 0,02	-	-	1,31 ± 0,18	0,57 ± 0,06
53	Daucen	1376	1755; 2,7	3,69 ± 0,95	12,2 ± 0,5	7,29 ± 1,43	1,20 ± 0,19	3,27 ± 0,45
54	seskviterpen 9	1378	1765; 2,8	0,38 ± 0,13	0,07 ± 0,01	0,39 ± 0,05	1,09 ± 0,14	0,79 ± 0,11
55	β-elemen	1388	1785; 2,9	0,63 ± 0,16	4,64 ± 0,28	8,86 ± 0,98	2,52 ± 0,48	2,14 ± 0,22
56	β-karyofylen	1418	1860; 3,0	0,12 ± 0,04	0,39 ± 0,07	0,69 ± 0,14	0,62 ± 0,09	0,35 ± 0,04
57	aromadendren	1432	1895; 3,0	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,92 ± 0,12	0,83 ± 0,13	0,42 ± 0,04
58	α-humulen	1452	1945; 3,2	0,20 ± 0,06	-	0,21 ± 0,02	1,50 ± 0,21	0,75 ± 0,06
59	seskviterpen 10	1462	1970; 3,1	0,05 ± 0,01	-	0,09 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,10 ± 0,01
60	seskviterpen 11	1470	1990; 3,1	0,18 ± 0,01	3,22 ± 0,23	6,06 ± 0,41	0,21 ± 0,02	0,40 ± 0,05
62	seskviterpen 13	1498	2060; 3,4	0,13 ± 0,03	-	0,16 ± 0,02	1,58 ± 0,13	0,76 ± 0,06
63	β-bisabolen	1502	2070; 2,9	0,69 ± 0,17	3,99 ± 0,28	4,73 ± 0,62	0,20 ± 0,01	0,51 ± 0,06
64	seskviterpen 14	1502	2070; 3,4	0,17 ± 0,01	-	-	1,59 ± 0,13	1,11 ± 0,11

č.	Název analytu	RI	RČ s	Maltóza mA·s·g ⁻¹	Fruktóza mA·s·g ⁻¹	Sacharóza mA·s·g ⁻¹	Xylóza mA·s·g ⁻¹	Manóza mA·s·g ⁻¹
65	δ-amorphen	1513	2095; 3,3	0,34 ± 0,08	3,99 ± 0,24	5,73 ± 0,67	1,03 ± 0,15	0,86 ± 0,08
66	dauca-4(11)-dien	1524	2120; 3,4	32,3 ± 3,2	108,1 ± 16,2	92,0 ± 8,9	16,1 ± 1,0	29,8 ± 0,4
67	seskviterpen 15	1555	2190; 3,2	4,52 ± 1,39	3,13 ± 0,21	0,21 ± 0,02	3,07 ± 0,22	5,24 ± 0,12
68	seskviterpen 16	1602	2300; 3,7	0,72 ± 0,15	1,01 ± 0,07	0,97 ± 0,15	1,17 ± 0,05	1,42 ± 0,06
69	seskviterpen 17	1618	2320; 3,6	0,20 ± 0,04	-	-	2,02 ± 0,21	1,82 ± 0,13
72	seskviterpen 18	1494	2050; 3,2	0,97 ± 0,08	4,37 ± 0,19	6,36 ± 1,03	1,17 ± 0,21	2,10 ± 0,19

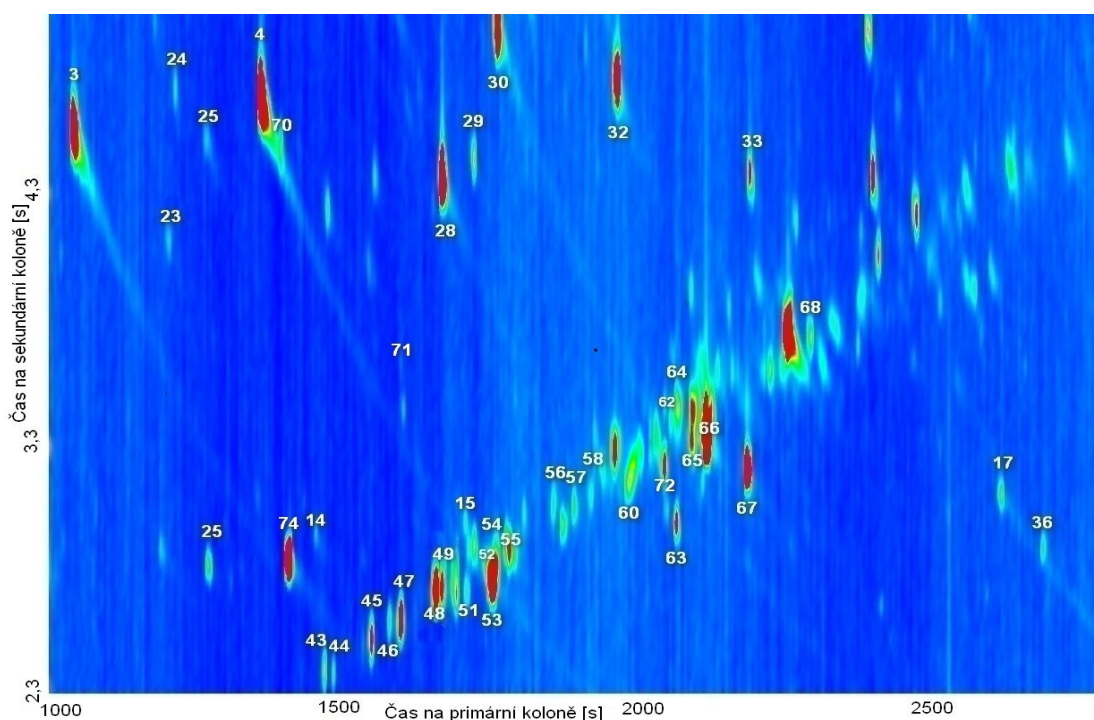
Poznámky:

Analyt 74 není uveden, jedná se o vnitřní standard 1-bromnonan

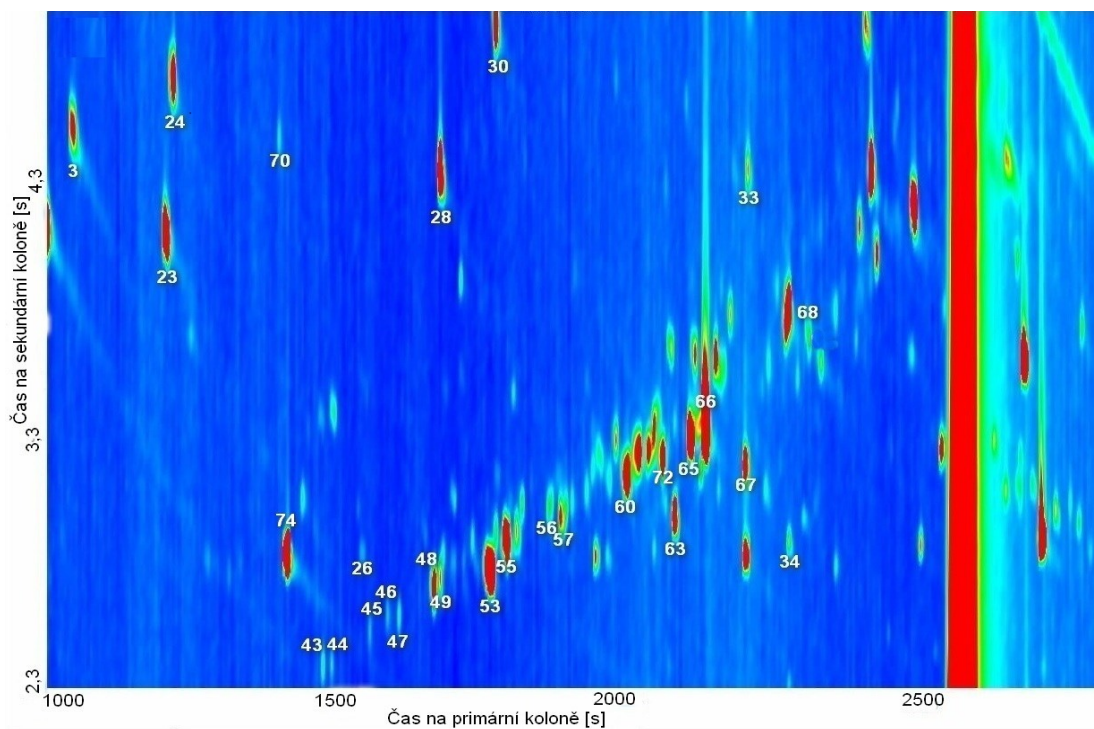
Analyt kyselina palmitová (18) a kyselina linolová (19) nebyly kvantifikovány, protože jejich obsah byl vysoký a docházelo k jejich zadržování na sekundární koloně přes více modulačních časů modulátoru, což znemožňovalo jejich přesnou kvantifikaci, pouze je uvedeno, zdali byly ve vzorku obsaženy či ne

V tabulce chybí analyty 50 a 61, které byly při pozdější kontrole dat vyřazeny z důvodu záměny

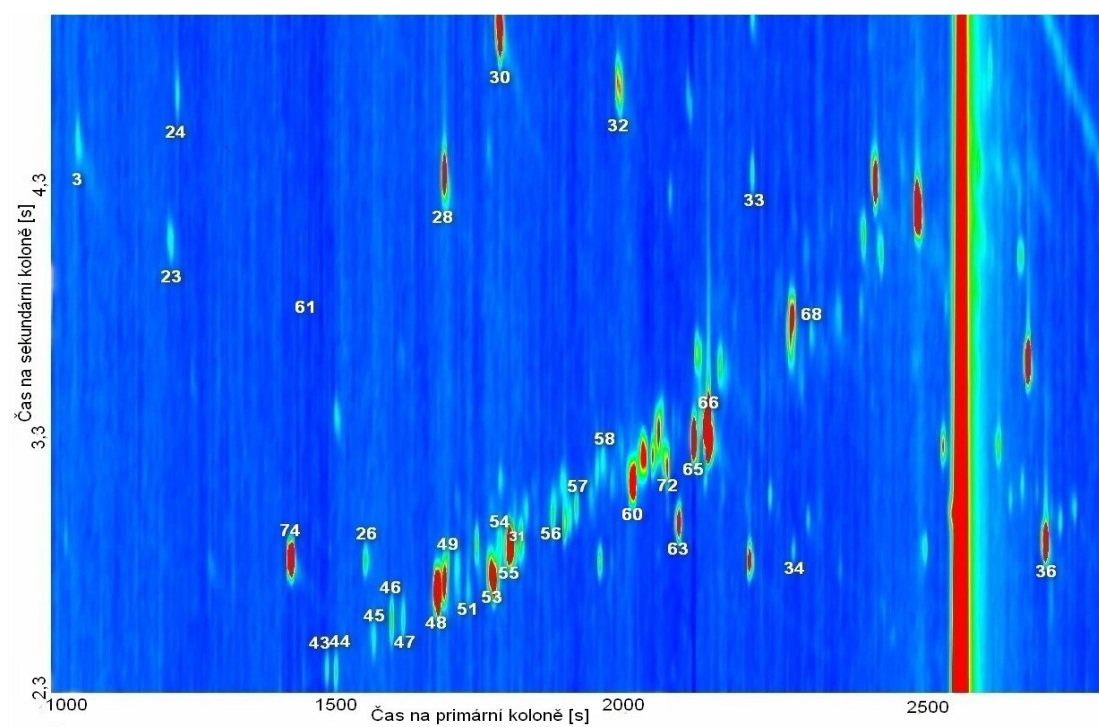
Přeškrtnuté buňky = hodnota analytu nebyla v daném prostředí naměřena



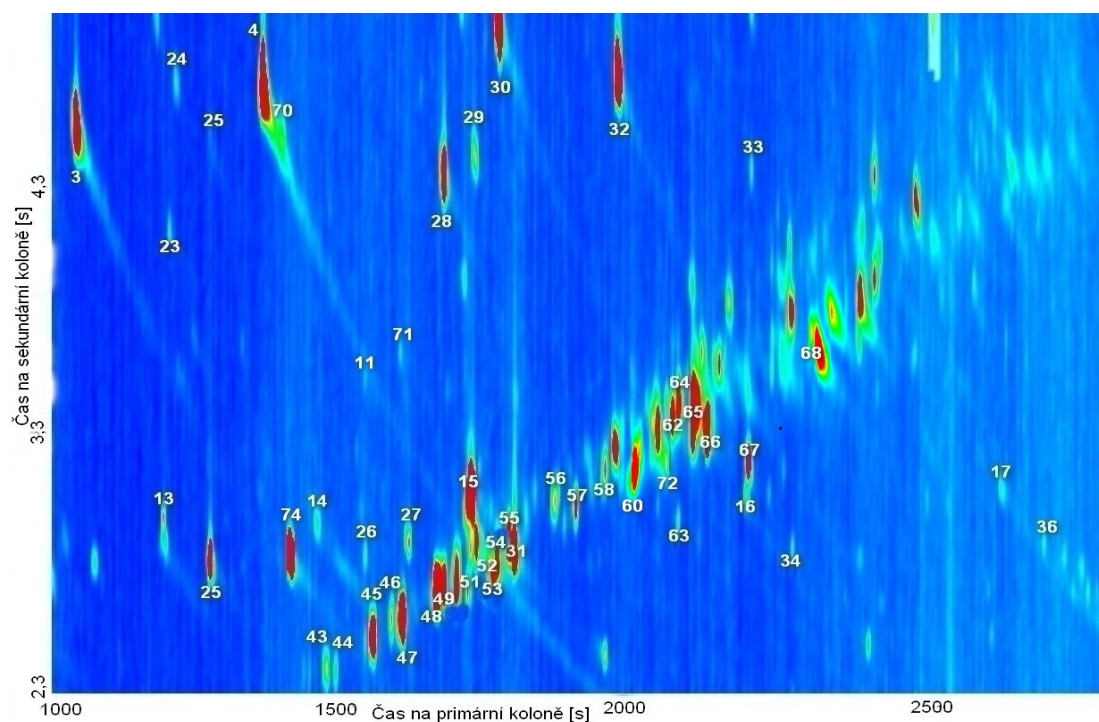
Obrázek 3 Reprezentativní 2D chromatogram naměřený pro vzorek *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaný ve vodném médiu obsahující sacharid maltózu



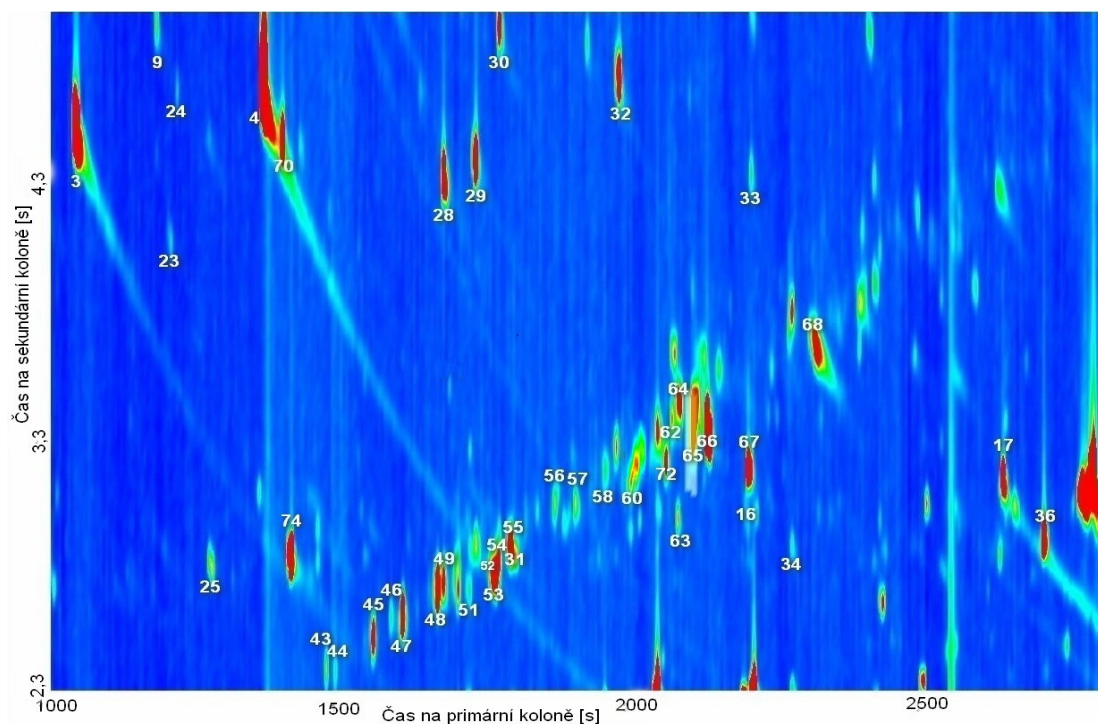
Obrázek 4 Reprezentativní 2D chromatogram naměřený pro vzorek *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaný ve vodném médiu obsahující sacharid fruktózu



Obrázek 5 Reprezentativní 2D chromatogram naměřený pro vzorek *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaný ve vodném médiu obsahující sacharid sacharózu



Obrázek 6 Reprezentativní 2D chromatogram naměřený pro vzorek *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaný ve vodném médiu obsahující sacharid xylózu



Obrázek 7 Reprezentativní 2D chromatogram naměřený pro vzorek *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaný ve vodném médiu obsahující sacharid manózu

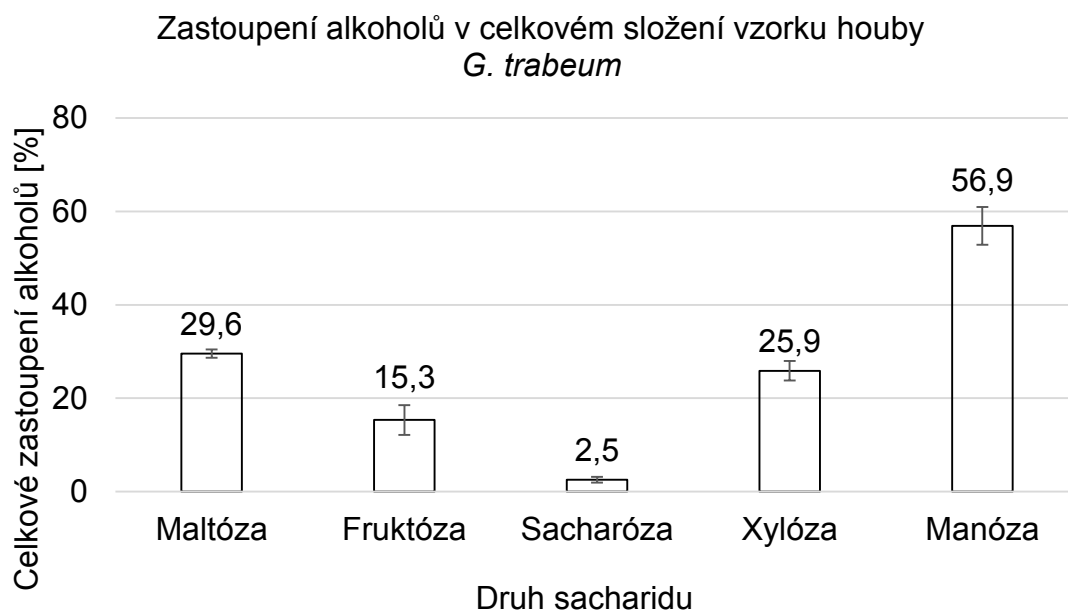
Každá plocha v 2D chromatogramu představuje jeden naměřený analyt, číslování analytů odpovídá tabulce (Tabulka 1). Intenzita signálu se zvyšuje od modré (nulový signál) až po červenou (maximální signál). Neoznačené analyty nebyly vyhodnocovány. Obrázky 2D chromatogramů jsou zobrazeny v rozsahu retenčních časů 1000 – 2800 sekund, celý chromatogram byl zaznamenáván v rozmezí časů 400 – 4560 sekund.

4.1.1 Alkoholy

Ve vzorcích houby *G. trabeum* kultivovaných ve vodném prostředí, bylo změřeno 5 alkoholů (Tabulka 1). Na obrázku (Obrázek 8) je znázorněno, že největší podíl produkovaných alkoholů z celkového množství naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících manózu $56,9 \pm 4,1\%$, následován $29,6 \pm 0,9\%$ pro maltózu, $25,9 \pm 2,1\%$ pro xylózu, $15,3 \pm 3,2\%$ pro fruktózu a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující sacharózu $2,5 \pm 0,1\%$.

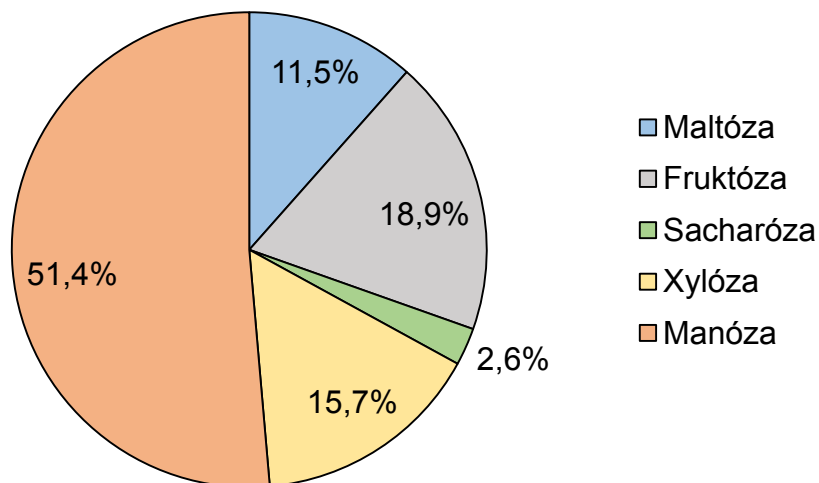
Ve srovnání produkce pouze alkoholů mezi vzorky (Obrázek 9) byl naměřen největší podíl náležící vzorku obsahující manózu 51,4%, 18,9% pro fruktózu, 15,7% pro xylózu, 11,5% pro maltózu a nejnižší produkce byla naměřena pro sacharózu 2,6% z celkového množství naměřených alkoholů mezi vzorky.

Analyt okt-1-en-3-ol (1) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu 14,0%, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid maltózu 3,8%, manózu 1,8% a sacharózu 1,0%, stopové množství bylo naměřeno ve vzorku obsahujícím sacharid xylózu. Analyt 2-fenylethan-1-ol (3) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid manózu 22,9%, maltózu 13,7% a xylózu 11,9%, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid fruktózu 2,3% a sacharózu 1,6%. Analyt 3-fenylpropan-1-ol (4) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid manózu 31,6%, xylózu 13,1% a maltózu 10,9%, ve fruktóze a sacharóze nebyl analyt naměřen. Analyt (*E*)-3-fenylprop-2-en-1-ol (5) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid maltózu 1,2%, ve vzorku obsahujícím manózu byl naměřen ve stopovém množství, v substrátech obsahujících sacharid xylózu, fruktózu a sacharózu nebyl naměřen. Analyt oktan-1-ol (2) byl naměřen ve stopovém množství v substrátech obsahujících sacharid manózu, xylózu a fruktózu, v maltóze a sacharóze nebyl naměřen.



Obrázek 8 Procentuální zastoupení alkoholů v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

Porovnání produkce alkoholů mezi vzorky *G. trabeum*

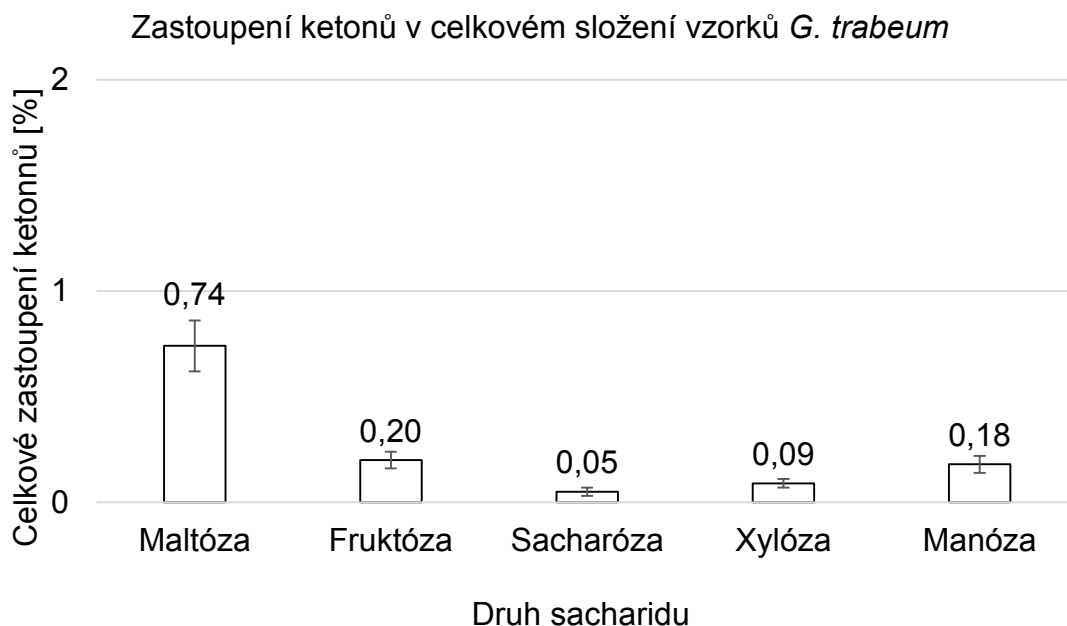


Obrázek 9 Procentuální zastoupení produkce alkoholů z celkového množství všech naměřených alkoholů ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

4.1.2 Ketony

Ve vzorcích houby *G. trabeum* kultivovaných ve vodném prostředí, byly změřeny 2 ketony (Tabulka 1). Na obrázku (Obrázek 10) je znázorněno, že největší podíl produkovaných ketonů z celkového obsahu naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících maltózu $0,74 \pm 0,12\%$, následován $0,20 \pm 0,04\%$ pro fruktózu, $0,18 \pm 0,04\%$ pro manózu, $0,09 \pm 0,02\%$ pro xylózu, a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující sacharózu $0,05 \pm 0,01\%$.

Analyt okt-3-on (6) byl naměřen ve stopovém množství ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid manózu, xylózu, fruktózu a maltózu, v sacharóze nebyl analyt naměřen. Analyt (5Z)-6,10-dimethyl-5,9-undekadien-2-on (73) byl naměřen ve stopovém množství ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu, xylózu, manózu a sacharózu, v prostředí maltózy nebyl analyt naměřen.



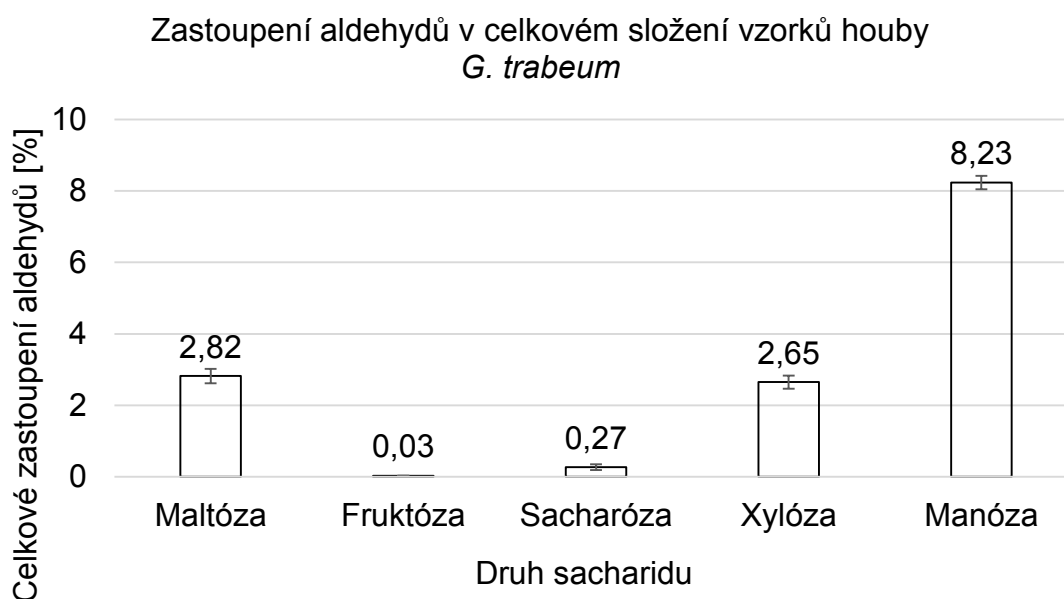
Obrázek 10 Procentuální zastoupení ketonů v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

4.1.3 Aldehydy

Ve vzorcích houby *G. trabeum* kultivovaných ve vodném prostředí, bylo změřeno 6 aldehydů (Tabulka 1). Na obrázku (Obrázek 11) je znázorněno, že největší podíl produkovaných aldehydů z celkového obsahu naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících manózu $8,23 \pm 0,19\%$, následován $2,83 \pm 0,20\%$ pro maltózu, $2,65 \pm 0,18\%$ pro xylózu, $0,27 \pm 0,08\%$ pro sacharózu a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující fruktózu $0,03 \pm 0,00\%$.

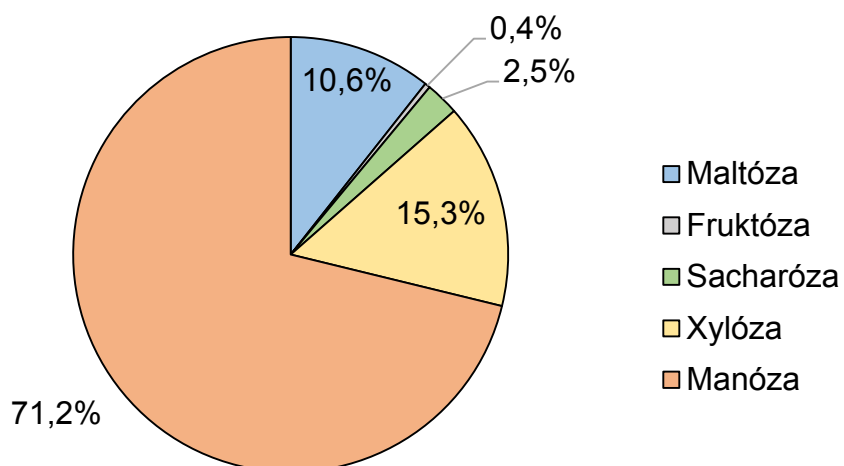
Ve srovnání produkce pouze aldehydů mezi vzorky (Obrázek 12) byl naměřen největší podíl náležící vzorku obsahujícímu manózu 71,2%, 15,3% pro xylózu, 10,6% pro maltózu, 2,5% pro sacharózu a nejnižší produkce byla naměřena pro fruktózu 0,4% z celkového množství naměřených aldehydů mezi vzorky.

Analyt (*E*)-3-fenylprop-2-en-1-al (10) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid manózu 7,9%, maltózu 2,4%, xylózu 2,1%, v sacharóze a fruktóze nebyl analyt naměřen. Ostatní těkavé organické látky patřící mezi aldehydy byly naměřeny ve stopovém množství nebo je nebylo možné vyhodnotit.



Obrázek 11 Procentuální zastoupení aldehydů v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

Porovnání produkce aldehydů mezi vzorky
G. trabeum



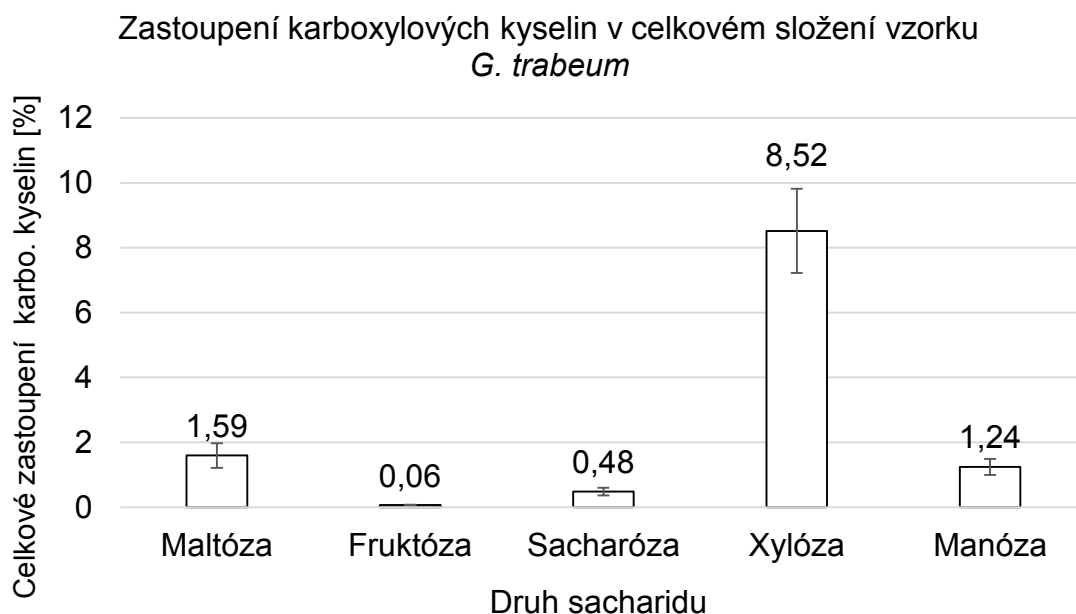
Obrázek 12 Procentuální zastoupení produkce aldehydů z celkového množství všech naměřených aldehydů ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

4.1.4 Karboxylové kyseliny

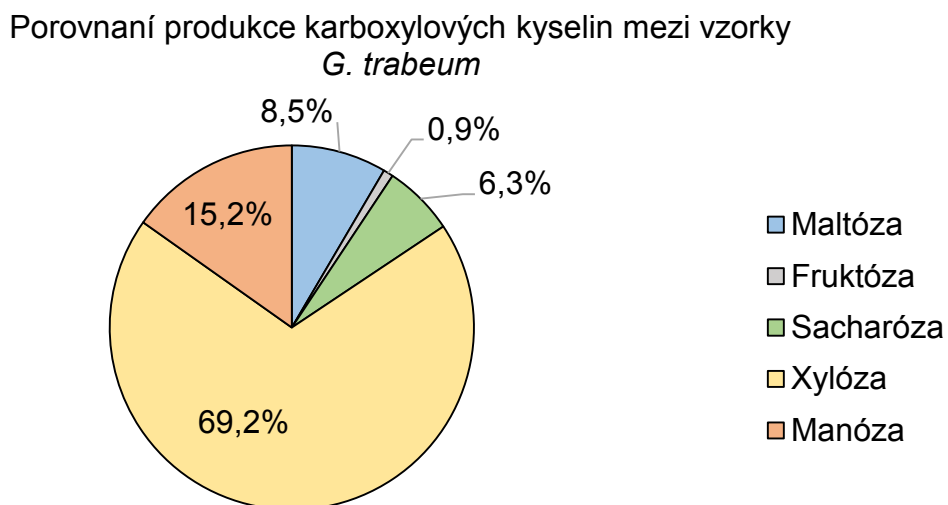
Ve vzorcích houby *G. trabeum* kultivovaných ve vodném prostředí, bylo změřeno 6 karboxylových kyselin a dvě nebylo možné kvantifikovat, ale pouze určit zda jsou ve vzorcích přítomné (Tabulka 1). Na obrázku (Obrázek 13) je znázorněno, že největší podíl produkovaných karboxylových kyselin z celkového množství naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících xylózu $8,52 \pm 1,3\%$, následován $1,58 \pm 0,38\%$ pro maltózu, $1,24 \pm 0,25\%$ pro manózu, $0,48 \pm 0,12\%$ pro sacharózu a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující fruktózu $0,06 \pm 0,01\%$.

Ve srovnání produkce pouze karboxylových kyselin mezi vzorky (Obrázek 14) byl naměřen největší podíl náležící vzorku obsahujícímu xylózu 69,2%, 15,2% pro manózu, 8,5% pro maltózu, 6,3% pro sacharózu a nejnižší produkce byla naměřena pro fruktózu 0,9% z celkového množství naměřených karboxylových kyselin mezi vzorky.

Analyt oktanová kyselina (13) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid xylózu 1,2%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství s výjimkou fruktózy, kde nebyl naměřen. Analyt dodekanová kyselina (15) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid xylózu 6,0%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství s výjimkou fruktózy, kde nebyl naměřen. Ostatní kyseliny byly ve vzorcích naměřeny buď ve stopovém množství, nebo jejich množství nebylo možné vyhodnotit. Analyt palmitová kyselina (18) byl přítomen ve vzorcích obsahujících maltózu, xylózu a manózu, ve fruktóze a sacharóze nebyl obsažen. Analyt linolová kyselina (19) byl přítomný ve všech vzorcích.



Obrázek 13 Procentuální zastoupení karboxylových kyselin v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku



Obrázek 14 Procentuální zastoupení produkce karboxylových kyselin z celkového množství všech naměřených karboxylových kyselin ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

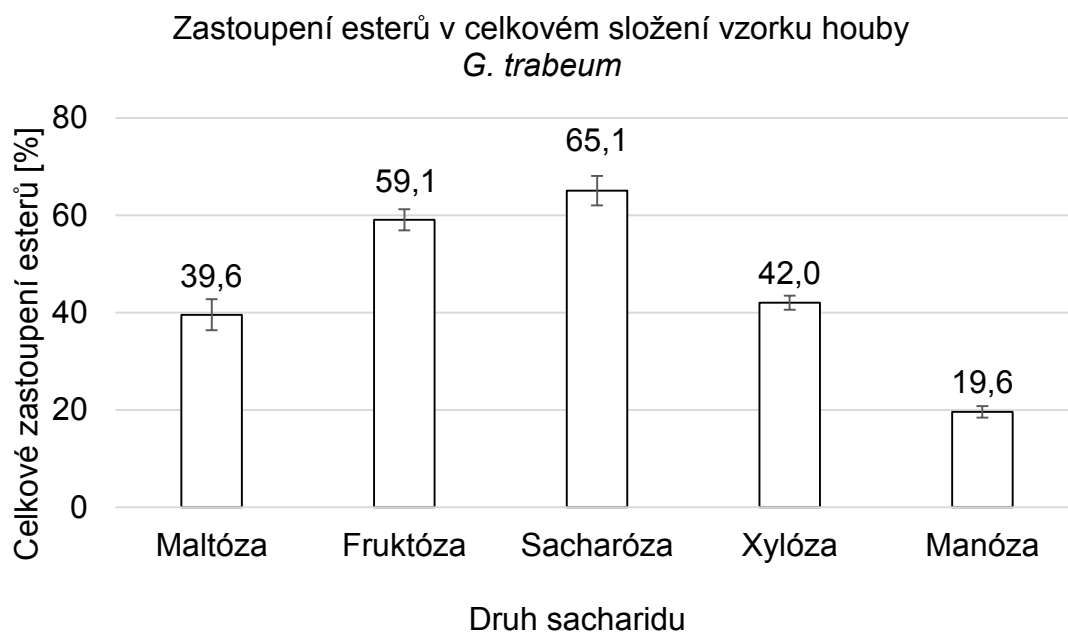
4.1.5 Estery karboxylových kyselin

Estery karboxylových kyselin byly druhá nejpočetnější skupin naměřených látek, celkově jich bylo ve vzorcích houby *G. trabeum*, kultivovaných ve vodném médiu změřeno 24 a zároveň vykazovaly i velkou chemickou diverzitu. Byly identifikovány estery nasycených i nenasycených karboxylových kyselin, estery kyselin obsahující aromatické jádro či estery karboxylových kyselin s vazbou na molekulu obsahující aromatické jádro. Z obrázku (Obrázek 15) vyplývá, že největší podíl produkovaných esterů karboxylových kyselin z celkového množství naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících sacharózu $65,1 \pm 3,0\%$, následován $59,1 \pm 2,2\%$ pro fruktózu, $42,1 \pm 1,4\%$ pro xylózu, $39,6 \pm 3,2\%$ pro maltózu a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující sacharózu $19,6 \pm 1,2\%$.

Ve srovnání produkce pouze esterů karboxylových kyselin mezi vzorky (Obrázek 16) byl naměřen největší podíl náležící vzorku obsahujícímu fruktózu $35,8\%$, následován $33,3\%$ pro sacharózu, $13,4\%$ pro xylózu, $9,4\%$ pro manózu a nejnižší produkce byla naměřena pro maltózu $8,1\%$ z celkového množství naměřených esterů mezi vzorky.

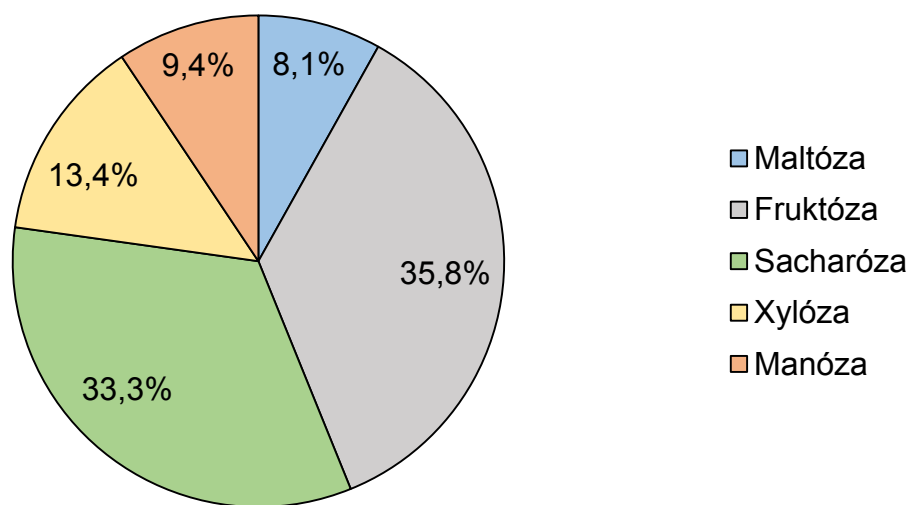
Analyt ethylester kyseliny 3-fenylpropanové (28) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid maltózu $12,6\%$, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid xylózu $6,0\%$, sacharózu $4,4\%$, fruktózu $3,0\%$, a $2,5\%$ manózu. Analyt methylester kyseliny (2E)-3-fenylprop-2-enové (30) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živém médiu sacharid maltózu $9,7\%$, sacharózu $9,3\%$ a xylózu $8,9\%$, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid fruktózu $1,8\%$ a manózu $1,1\%$. Analyt ethylester kyseliny dekanové (32) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid xylózu $10,2\%$, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid maltózu $5,6\%$, sacharózu $2,8\%$ a $2,3\%$ manózu, v substrátu obsahujícím sacharid fruktózu bylo naměřeno stopové množství. Analyt ethylester kyseliny tetradekanové (36) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu $8,3\%$, zastoupen jako minoritní komponenta byl v substrátech obsahujících sacharid sacharózu $5,6\%$ a manózu $2,6\%$, v substrátech obsahujících maltózu a xylózu bylo naměřeno stopové množství. Analyt ethylester kyseliny heptanové (41) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu

29,9% a sacharózu 29,3%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopové množství. Analyt ethylester kyseliny benzoové (23) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu 4,7% a sacharózu 1,0%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt methylester kyseliny fenyloctové (24) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu 3,6%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt ethylester kyseliny oktanové (25) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid xylózu 4,4%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt ethylester kyseliny fenyloctové (70) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid manózu, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt 3-fenylpropylester kyseliny octové (29) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid manózu, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt ethylester kyseliny dekanové (31) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid xylózu, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt methylester kyseliny 5-fenylpentanové (33) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid maltózu, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt ethylester kyseliny palmitové (39) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid sacharózu 2,5% a fruktózu 1,3%, v substrátu obsahujícím maltózu byl naměřen ve stopovém množství, v substrátech obsahujících xylózu a manózu nebylo jeho množství naměřeno. Analyt methylester kyseliny linolové (40) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid sacharózu 5,9% a fruktózu 3,0%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt ethylester kyseliny linolové (42) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid maltózu 4,7% a sacharózu 1,6%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Ostatní těkavé organické látky patřící mezi estery byly naměřeny ve stopovém množství nebo je nebylo možné vyhodnotit.



Obrázek 15 Procentuální zastoupení esterů v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

Porovnání produkce esterů mezi vzorky *G. trabeum*



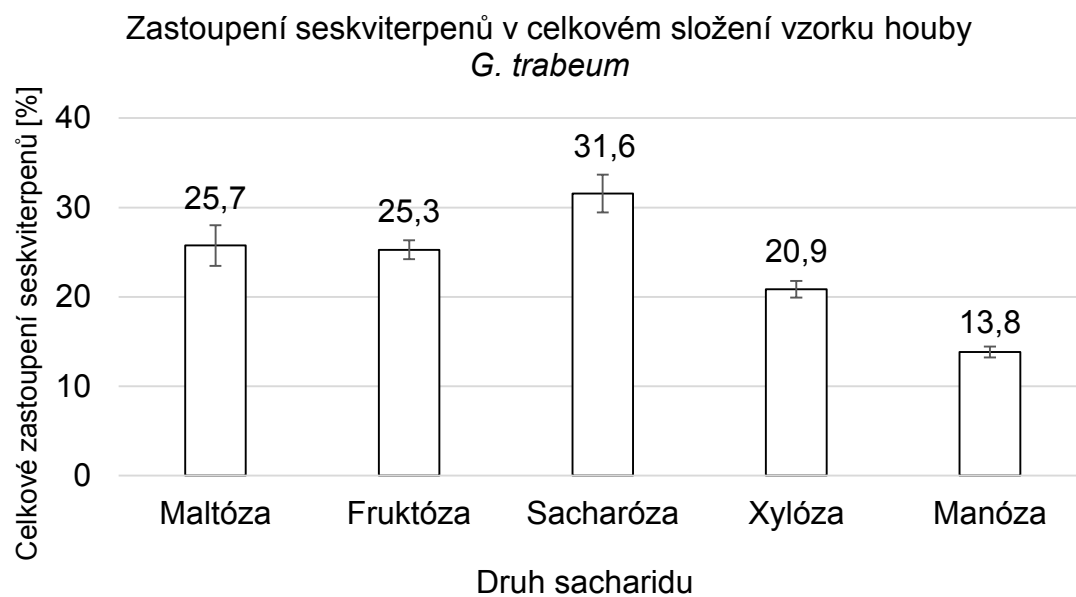
Obrázek 16 Procentuální zastoupení produkce esterů z celkového množství všech naměřených esterů ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

4.1.6 Seskviterpeny

Seskviterpeny byly nejpočetnější skupina naměřených látek, celkově jich bylo ve vzorcích houby *G. trabeum*, kultivovaných ve vodném prostředí změřeno 26. Z obrázku (Obrázek 17) vyplývá, že největší podíl produkovaných seskviterpenů z celkového množství naměřených těkavých organických látek byl ve vzorcích obsahujících sacharózu $31,6 \pm 2,1\%$, následován $25,7 \pm 2,3\%$ pro maltózu, $25,3 \pm 1,1\%$ pro fruktózu, $20,9 \pm 0,9\%$ pro xylózu a nejmenší podíl byl naměřen pro vzorek obsahující manózu $13,8 \pm 0,6\%$.

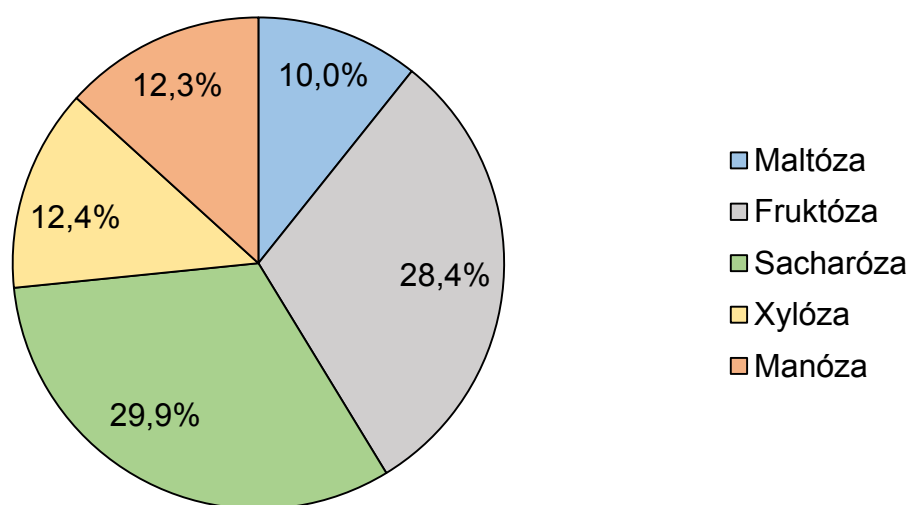
Ve srovnání produkce pouze seskviterpenů mezi vzorky (Obrázek 18) byl naměřen největší podíl náležící vzorku obsahujícímu sacharózu 29,9%, následován 28,4% pro fruktózu, 12,4% pro xylózu, 12,3% pro manózu a nejnižší produkce byla naměřena pro maltózu 10,0% z celkového množství všech naměřených seskviterpenů mezi vzorky.

Analyt dauca-4(11)-dien (66) byl zastoupen jako hlavní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid sacharózu 18,4%, fruktózu 18,0% a maltózu 16,0%, jako minoritní komponenta byl zastoupen ve vzorcích obsahujících sacharid manózu 6,4% a xylózu 5,1%. Analyt terpen 3 (45) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid xylózu 1,3%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt terpen 5 (47) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid xylózu 2,4%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt terpen 6 (48) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid xylózu 3,0%, sacharózu 2,6% a maltózu 1,3%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt daucen (53) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid fruktózu 2,0%, maltózu 1,8% a sacharózu 1,5%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt terpen 15 (68) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících v živném médiu sacharid maltózu 2,2% a manózu 1,1%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Analyt terpen 18 (72) byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorku obsahujícím v živném médiu sacharid sacharózu 1,3%, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Ostatní těkavé organické látky patřící mezi seskviterpeny byly naměřeny ve stopovém množství nebo jejich množství nebylo možné vyhodnotit.



Obrázek 17 Procentuální zastoupení seskviterpenů v celkovém složení extraktu *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

Porovnaní produkce seskviterpenů mezi vzorky *G. trabeum*



Obrázek 18 Procentuální zastoupení produkce esterů z celkového množství všech naměřených esterů ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku

4.2 Statistické vyhodnocení naměřených výsledků

Ke statistickému vyhodnocení rozdílů naměřených dat produkce těkavých organických látek houbou *G. trabeum*, kultivované ve vodném prostředí obsahujícím různé druhy sacharidů, byla použita statistická metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Vyhodnocení bylo provedeno pro data vypočtená v absolutním množství, tak jak jsou uvedena v tabulce (Tabulka 1).

Uvedené jsou vždy dva grafy pro každou PCA analýzu, první graf znázorňuje hodnoty prvních dvou faktorů PC1 a PC2 pro 21 analyzovaných vzorků. Druhý graf znázorňuje koordináty vektorů PCA pro faktory PC1 a PC2, každý vektor přísluší jednotlivému naměřenému analytu, číselné označení vektorů odpovídá značení analytů v tabulce (Tabulka 1).

Z obrázků (Obrázek 19 a Obrázek 20) je zřejmé, že některé charakteristické analyty mají vysoké zastoupení pouze ve vzorcích obsahující specifický sacharid. Pro dva vektory platí, že čím menší svírají vzájemný úhel, tím větší mají vzájemnou korelaci, pokud svírají mezi sebou ostrý úhel, mají vzájemnou přímou korelaci, pokud svírají úhel 90° tak je nepravděpodobné, že mají vzájemnou korelaci, pokud divergují od sebe a svírají úhel blízký 180° tak mají vzájemnou nepřímou korelaci.

Dále kromě toho, že bylo možné vyhodnotit v jakém prostředí je daný analyt nejvíce produkován na základě pozice jemu příslušnému vektoru, bylo možné pozorovat jaký vliv má na produkci analytu kultivační prostředí obsahující glukózu či fruktózu. To bylo možné z důvodu toho, že tři kultivační prostředí měla vzájemné vztahy ve složení. První kultivační prostředí obsahovalo sacharid maltózu, tento disacharid je složený z dvou glukózových jednotek. Druhé kultivační prostředí obsahovalo sacharid fruktózu, tento monosacharid je složený pouze z monomerů fruktózy. Třetí kultivační prostředí obsahovalo sacharid sacharózu, tento disacharid je složený z jedné glukózové a jedné fruktózové jednotky. Z tohoto důvodu bylo možné pozorovat vliv těchto sacharidů na produkci sekundárních metabolitů houby *G. trabeum*. Každý kultivační roztok obsahoval také glukózu o hmotnostní koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, glukóza sloužila pro aktivaci a urychlení růstu kolonií houby *G. trabeum* na počátku kultivace. Předpokládalo se, že glukóza bude houbou spotřebována dříve, než hlavní sacharid přítomný v roztocích, a proto po uplynutí

inkubační doby 21 dní, již nebude mít glukóza vliv na produkci těkavých organických látek.

Vzorky kultivované v prostředí fruktózy byly charakterizovány vyšším naměřeným množstvím analytů 1, 38, 24 a 53. Analyt 36 byl zastoupen nejvíce v prostředí fruktózy, s vysokým obsahem v sacharóze a maltóze. Vzorky kultivované v prostředí sacharózy byly charakterizovány významně vyšším naměřeným množstvím analytů 55 a 26. Analyty 39, 40, 60, 65, 72 byly nejvíce zastoupeny v sacharóze, a následně ve fruktóze. Analyty 35, 41 a 63 byly stejně zastoupeny v sacharóze i fruktóze. Analyt 34 byl srovnatelně zastoupen ve fruktóze a sacharóze, v manóze byl zastoupen dvakrát méně. Analyt 66 byl zastoupen stejně ve fruktóze a sacharóze, třikrát méně byl zastoupen v maltóze a manóze. Analyty 44 a 46, 49 byly nejvíce zastoupeny v sacharóze, v xylóze bylo naměřeno dvakrát větší množství než v maltóze a manóze. Vzorky obsahující xylózu byly charakterizovány významně vyšším naměřeným množstvím analytů 13, 15, 22, 25, 27, 31 a 32. Analyty 20, 64 a 69 byly srovnatelně zastoupeny ve vzorcích obsahující xylózu a manózu.

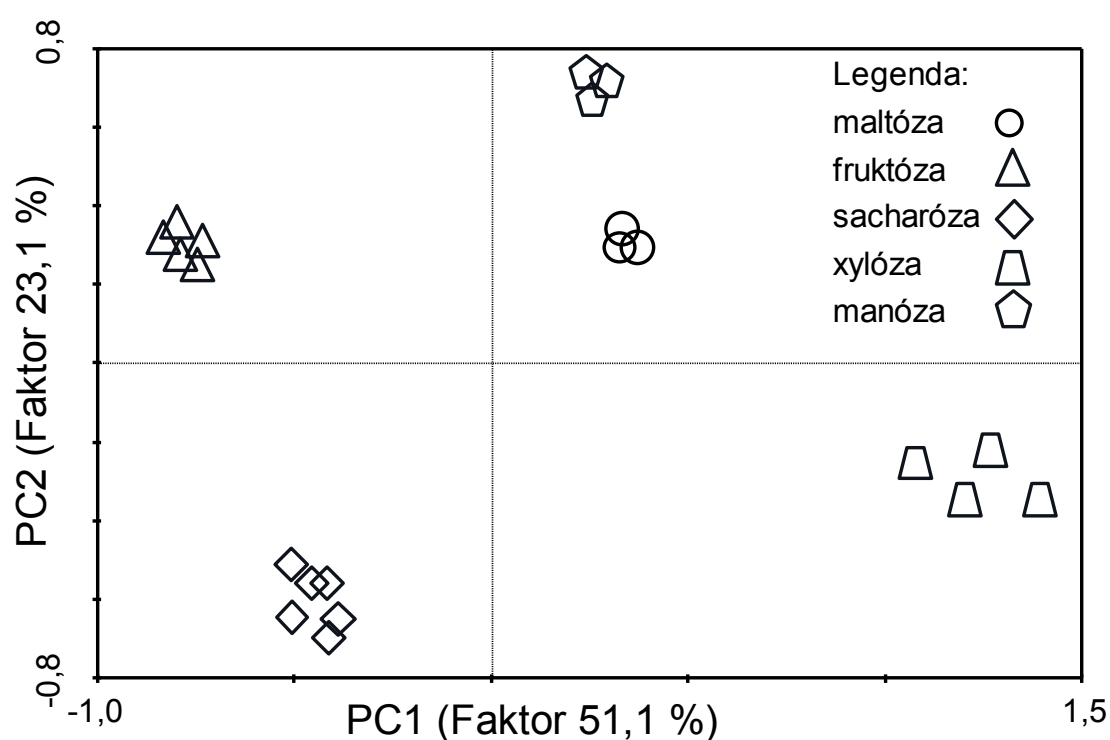
Analyty 14, 21 a 52 byly dvakrát více zastoupeny ve vzorcích xylózy než manózy a maltózy. Analyty 47, 54 a 58 byly nejvíce zastoupeny ve vzorcích xylózy, v manóze bylo naměřeno o polovinu menší množství a v ostatních prostředích bylo naměřeno vzájemně srovnatelné množství s výjimkou fruktózy, kde bylo naměřeno množství na hranici meze stanovitelnosti. Vzorky obsahující manózu byly charakterizovány významně vyšším naměřeným množstvím analytů 4, 3, 10, 17, 29 a 70. Analyt 5 byl zastoupen v manóze ve vyšším množství, ale zároveň měl srovnatelné zastoupení i ve vzorku obsahujícím maltózu.

Vzorky obsahující maltózu byly charakterizovány významně vyšším naměřeným množstvím analytu 6.

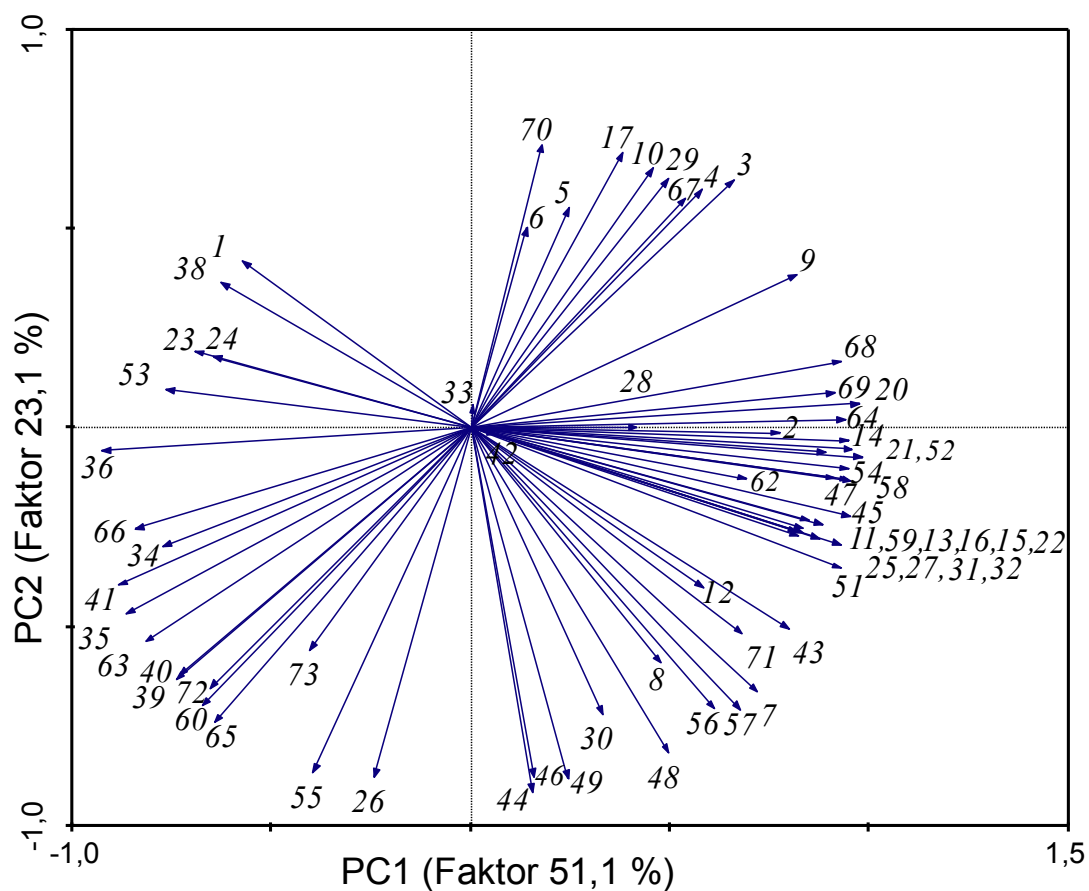
Analyty 28 a 68 byly srovnatelně zastoupeny ve všech vzorcích.

Některé naměřené estery, například analyty 28, 30, 32, 33, byly pouze v nízké shodě s použitým modelem PCA. Některé estery, které by z vypočtených dat uvedených v tabulce (Tabulka 1) měly mít viditelnou vzájemnou korelaci, nedokázal použitý model

PCA pro analýzu všech naměřených dat správně přiřadit. Proto byly dále vypracovány další dva nezávislé modely PCA, které obsahovaly pouze naměřená data ze skupiny esterů a seskviterpenů. Podezření na nevyhovující model bylo zároveň podpořeno obrázky 16 a 18, které zobrazují procentuální zastoupení esterů resp. seskviterpenů ve vzorcích *G. trabeum* z celkového obsahu všech naměřených esterů resp. seskviterpenů. Celkové množství esterů produkovaných v roztocích obsahující sacharózu a fruktózu bylo 33,3% resp. 35,8%, podobný trend lze spatřit i mezi manózou 9,4% a maltózou 8,1%. Podobný případ jsou i seskviterpeny, kde nejvíc seskviterpenů bylo produkováno ve vzorcích obsahující sacharózu 29,9% a 28,4% pro fruktózu, následovány 12,4% pro vzorky obsahující xylózu a 12,3% pro manózu.



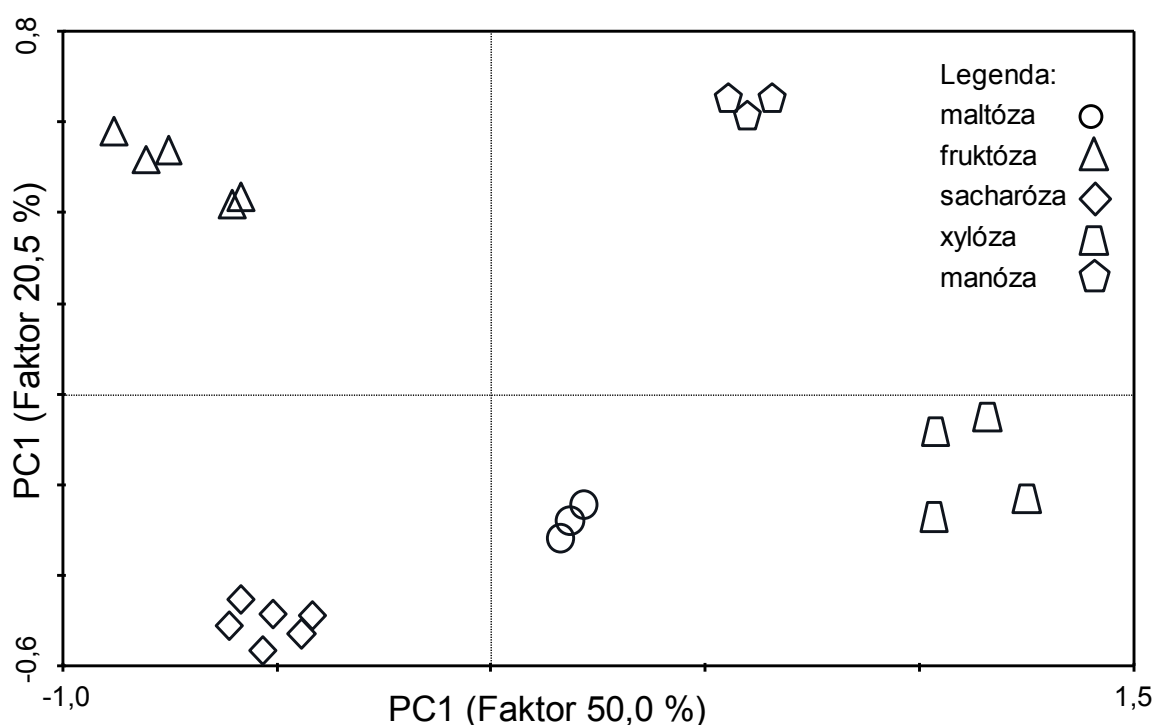
Obrázek 19 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku: Graf znázorňuje hodnoty prvních dvou faktorů PCA, pro 21 analyzovaných vzorků, příslušnost vzorků k jednotlivým sacharidům znázorněna graficky. PCA byla provedena s pomocí vypočtených hmotnostních ploch všech naměřených analytů, zobrazený model PCA popisuje 74,4% z celkové variability v souboru analyzovaných dat



Obrázek 20 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku: Graf znázorňuje koordináty vektorů PCA pro faktory PC1 a PC2, které odpovídají normalizovanému zastoupení jednotlivých analytů, jednotlivé vektory odpovídají značení analytů v tabulce (Tabulka 1)

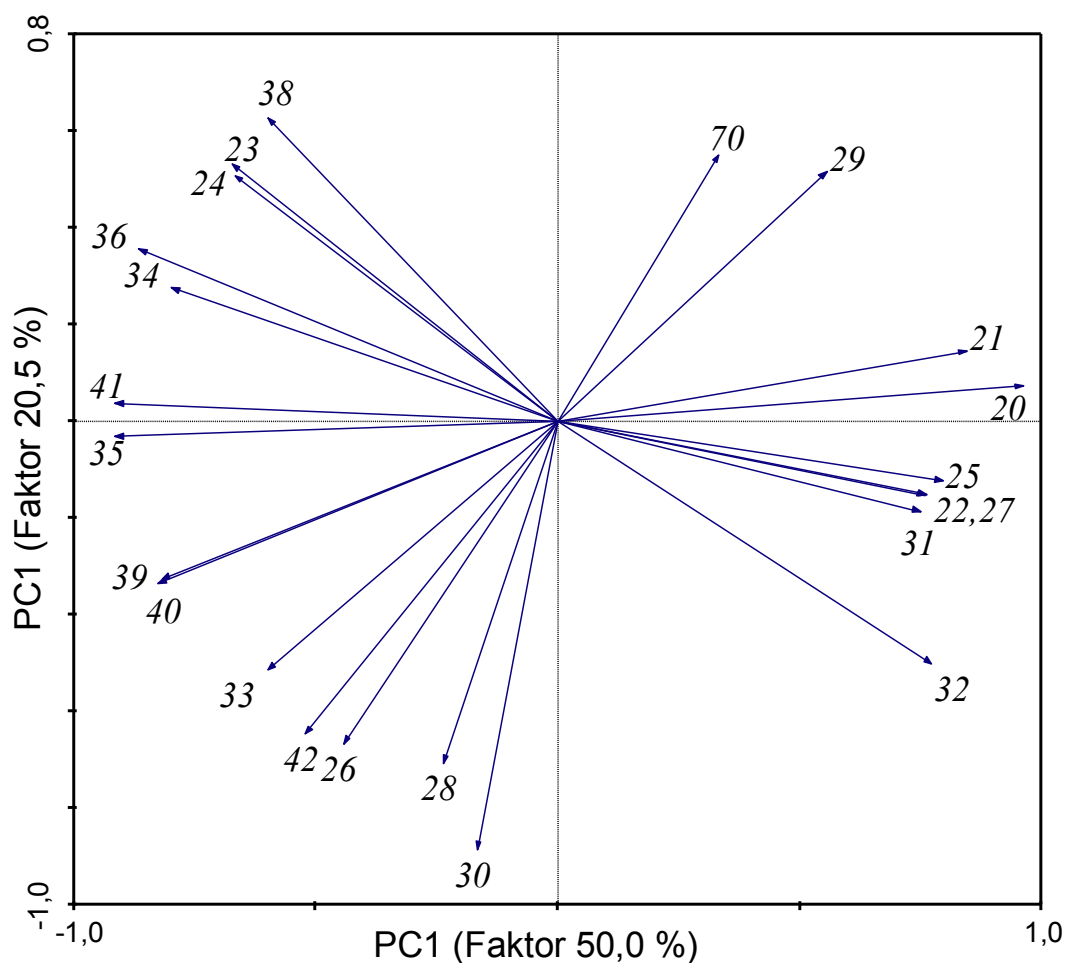
4.2.1 PCA estery karboxylových kyselin

Z grafů PCA analýzy skupiny esterů (Obrázek 21 a Obrázek 22) je zřejmé, že některé charakteristické analyty mají vysoké zastoupení pouze ve vzorcích obsahující specifický sacharid. Estery 28 a 30 se vyznačovaly vysokým obsahem ve vzorcích kultivovaných v přítomnosti všech sacharidů. Ester 28 byl nejvíce zastoupen ve vzorcích obsahujících maltózu, srovnatelné množství bylo naměřeno ve fruktóze, sacharóze a xylóze, nejnižší množství pak v manóze. Ester 28 byl naměřen ve všech substrátech v minimálním zastoupení odpovídajícím minoritnímu množství.



Obrázek 21 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku: Graf znázorňuje hodnoty prvních dvou faktorů PCA, pro 21 analyzovaných vzorků, příslušnost vzorků k jednotlivým sacharidům znázorněna graficky. PCA byla provedena s pomocí vypočtených hmotnostních ploch pro všechny naměřené estery, zobrazený model PCA popisuje 70,5% z celkové variability v souboru analyzovaných dat

Ester 30 byl nejvíce zastoupen v prostředí obsahujícím sacharózu, následován xylózou a maltózou, s nižším obsahem ve fruktóze a nejnižším v manóze. Z těchto naměřených dat je patrný pozitivní vliv na produkci esteru 30 z v prostředí maltózy a xylózy. Srovnání produkce v přítomnosti fruktózy a manózy vede k závěrům, že fruktóza přispívá k vyšší produkci esteru 30 než manóza, pozitivní vliv způsobený glukózou a fruktózou na produkci esteru 30 lze zjevně pozorovat ve vzorcích kultivovaných v prostředí sacharózy.



Obrázek 22 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kulturačním roztoku: Graf znázorňuje koordináty vektorů PCA pro faktory PC1 a PC2, které odpovídají normalizovanému zastoupení jednotlivých analytů ve skupině estery, jednotlivé vektory odpovídají značení analytů v tabulce (Tabulka 1)

Ester 33 měl srovnatelné množství produkované v maltóze a sacharóze, s nižším množstvím v prostředí fruktózy a nejnižším množstvím v xylóze a manóze, což poukazuje na pozitivní vliv pro produkci analytu, pokud je v kultivačním prostředí přítomná glukóza. Ester 32 se vyznačoval vysokou produkcí v prostředí xylózy a srovnatelnou produkcí v prostředí maltózy, sacharózy a manózy. Ve fruktóze byl ester 32 naměřen ve stopovém množství, což vede k závěru, že prostředí fruktózy mělo negativní vliv na produkci esteru 32. Estery 35 a 41 byly nejvíce zastoupeny ve fruktóze a sacharóze, v maltóze bylo naopak množství esterů 35 a 41 nejnižší, což vede k závěru, že v prostředí maltózy nejsou tyto estery produkovány. Estery 35 a 41, jejich produkce zjevně závisela na přítomnosti fruktózy v kultivačních roztocích, protože vysoká produkce byla naměřena pouze ve vzorcích obsahujících fruktózu a sacharózu, což platilo zejména pro ester 41, který byl ve vzorcích fruktózy a sacharózy zastoupen v množství odpovídající podílu hlavní komponenty. Estery 39 a 40 se vyznačovaly vysokou produkcí v prostředí fruktózy a sacharózy. Pro tyto látky je tedy zřejmý pozitivní vliv fruktózy na jejich produkci. Nízký obsah těchto esterů byl naměřen ve všech ostatních substrátech. Pro estery 34 a 36 byl naměřen vysoký obsah ve vzorcích obsahujících fruktózu, se zhruba polovičním obsahem v prostředí sacharózy. Ester 34 byl naměřen ve všech vzorcích ve stopovém množství. Na produkci esteru 36 mělo zjevně pozitivní vliv kultivační prostředí obsahující fruktózu. Ester 23 byl zastoupen jako minoritní komponenta ve vzorcích obsahujících fruktózu a sacharózu, v ostatních substrátech byl naměřen ve stopovém množství. Z vysokého množství naměřeného ve vzorku obsahujícím fruktózu lze vyvozovat závěr, že fruktóza působila pozitivním vlivem na jeho produkci. Ester 24 byl zastoupen v množství odpovídajícím minoritní komponentě ve vzorcích obsahujících fruktózu, v ostatních prostředích byl naměřen ve stopovém množství. Z vysokého množství naměřeného ve vzorku obsahujícím fruktózu lze vyvozovat závěr, že fruktóza působila pozitivním vlivem na jeho produkci. Všechny naměřené estery, které náležejí zobrazeným vektorům mířících do 1. a 3. kvadrantu grafu (Obrázek 22), vykazovaly vzájemné vztahy mezi produkcí těchto esterů a přítomností glukózy či fruktózy v kultivačním médiu.

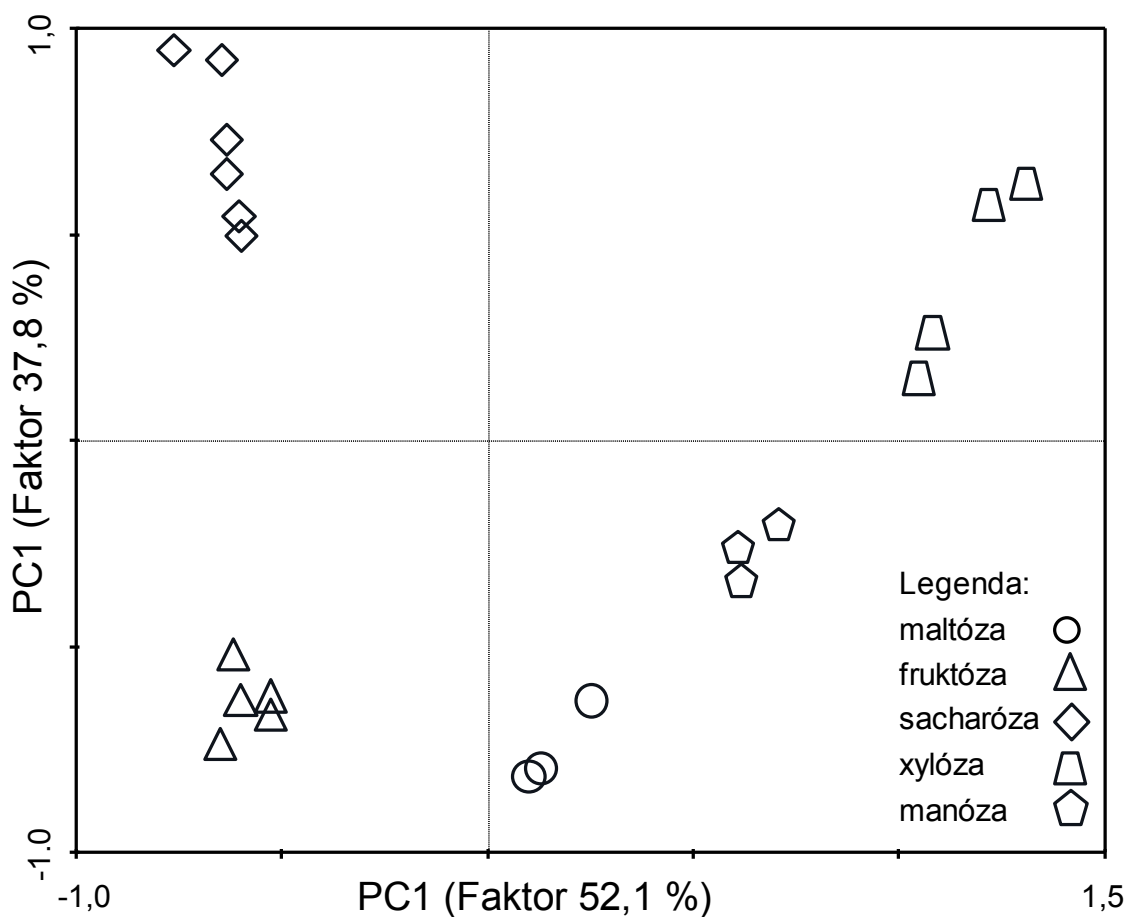
Estery 29 a 70 se vyznačovaly vysokou produkcí v prostředí manózy, v ostatních prostředích byly naměřeny ve stopovém množství. Estery 20 a 21 byly naměřeny ve všech prostředích ve stopovém množství, se srovnatelnou produkcí v prostředí xylózy a

manózy. Estery 22, 25, 27 a 31 se vyznačovaly vysokou produkcí v prostředí xylózy, v ostatních prostředích byly estery naměřeny ve stopovém množství.

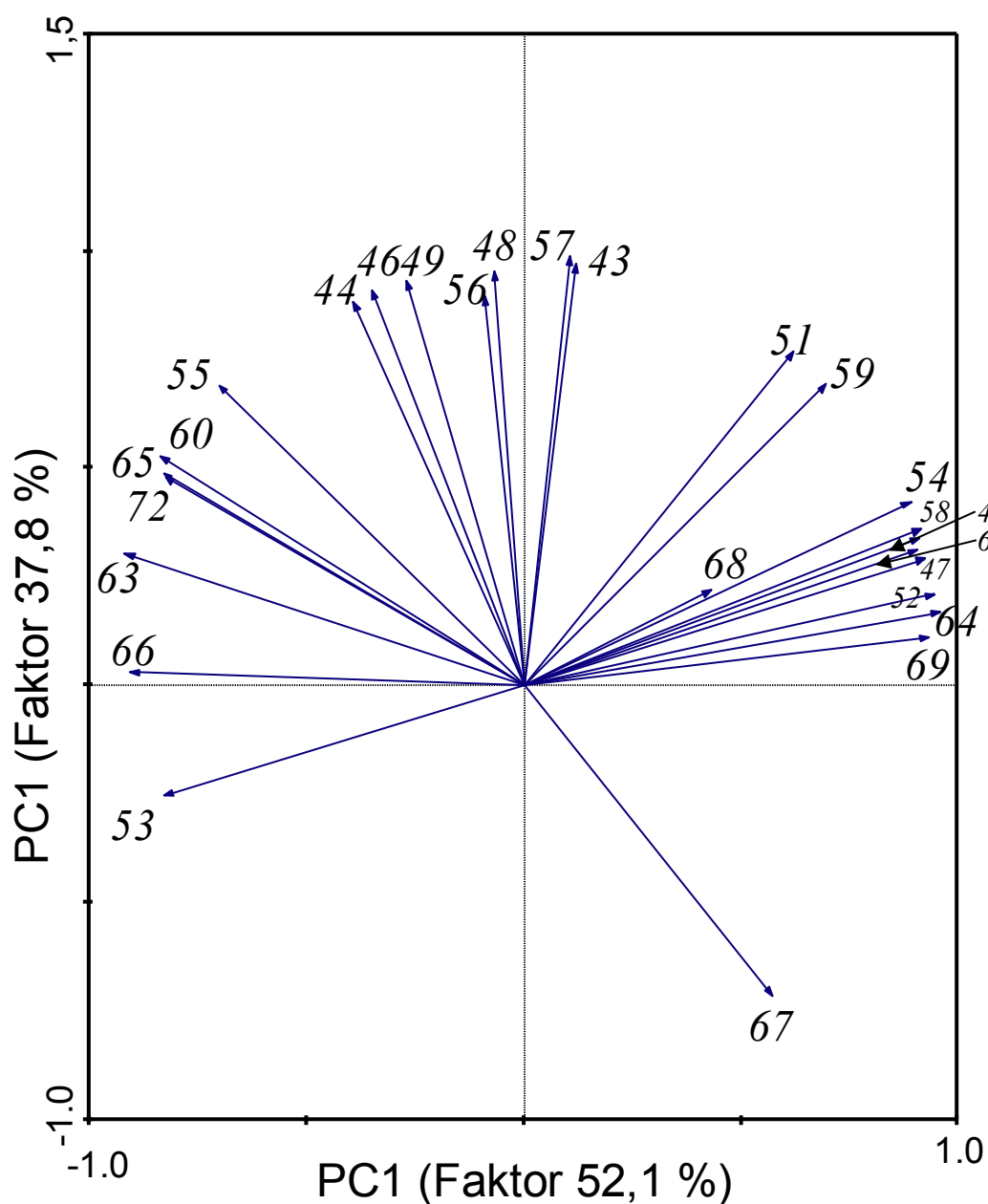
4.2.2 PCA seskviterpeny

Z grafů PCA analýzy skupiny seskviterpenů (Obrázek 23 a Obrázek 24) je zřejmé, že některé charakteristické analyty mají vysoké zastoupení pouze ve vzorcích obsahujících specifický sacharid. Množství produkovaných seskviterpenů ve většině vzorků bylo v rozsahu stopového množství, s několika výjimkami. Označení seskviterpenů odpovídá tabulce (Tabulka 1). Vektor popisující seskviterpen 15 (67) leží jako jediný jasně oddělený od všech ostatních, jeho směr indukuje, že ve všech prostředích kromě sacharózy byl obsažen v minoritním zastoupení, pouze v sacharóze byl zastoupen ve stopovém množství. Seskviterpen daucen (53) byl nejvíce zastoupen v prostředí fruktózy, následován polovičním obsahem v sacharóze, v maltóze a xylóze byl obsažen ve srovnatelném množství zhruba dvakrát menším než v sacharóze, v manóze byl zastoupen ve stopovém množství. Z naměřených dat je zřejmý pozitivní vliv na produkci daucenu (53) v prostředí obsahujícím fruktózu. O podobný případ se jedná i u seskviterpenu dauca-4(11)-dien (66), který byl zastoupen ve srovnatelném vysokém množství ve fruktóze a sacharóze, v maltóze a xylóze byl zastoupen ve vzájemně srovnatelném množství, v manóze jeho zastoupení odpovídalo minoritnímu množství. Z naměřených dat je zřejmý vysoký vliv fruktózy na jeho produkci. Seskviterpen β -bisabolen (63) byl zastoupen rovnocenně ve fruktóze a sacharóze, kde jeho zastoupení odpovídalo minoritnímu množství, v ostatních prostředích byl zastoupen ve stopovém množství. Z naměřených dat je zřejmý pozitivní vliv fruktózy na produkci seskviterpenu β -bisabolen (63). Seskviterpeny seskviterpen 11 (60), δ -amorphen (65) a seskviterpen 18 (72) mají nejvyšší zastoupení v prostředí sacharózy, následně ve fruktóze a srovnatelně v manóze a xylóze, v maltóze byl naměřen detekční limit. Seskviterpeny 65, 44, 46, 49, 56, 48, 57 a 43 mají nejvyšší zastoupení v prostředí sacharózy, ale i tak jejich zastoupení odpovídá pouze stopovému množství. To platí i pro ostatní prostředí u těchto seskviterpenů. Seskviterpeny 51 a 59 mají nejvyšší zastoupení v prostředí xylózy, i tak se jedná pouze o stopové množství těchto seskviterpenů, to platí i pro ostatní prostředí. Seskviterpen 68 má podobnou produkci ve všech prostředích, nejvyšší zastoupení má v manóze, v ostatních prostředích má srovnatelné zastoupení, ale i tak je jeho zastoupení ve všech prostředích pouze ve stopovém množství. Seskviterpeny 45, 47, 52, 54, 58, 62

měly největší zastoupení v prostředí xylózy a zhruba poloviční zastoupení v prostředí manózy, v ostatních substrátech byly zastoupeny ve stopovém množství. Seskviterpeny 64 a 69 měly stejné zastoupení v xylóze a manóze, v ostatních prostředích byly zastoupeny ve stopovém množství.



Obrázek 23 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku: Graf znázorňuje hodnoty prvních dvou faktorů PCA, pro 21 analyzovaných vzorků, příslušnost vzorků k jednotlivým sacharidům znázorněna graficky. PCA byla provedena s pomocí vypočtených hmotnostních ploch pro všechny naměřené seskviterpeny, zobrazený model PCA popisuje 89,9% z celkové variability v souboru analyzovaných dat

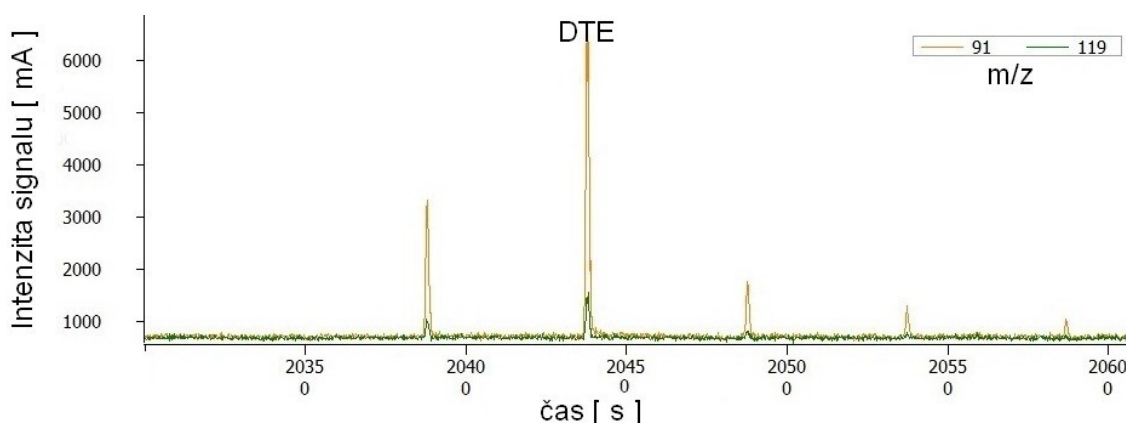


Obrázek 24 Analýza hlavních komponent produkovaných těkavých organických látek houbou *G. trabeum* v závislosti na sacharidu přítomném v kultivačním roztoku: Graf znázorňuje koordináty vektorů PCA pro faktory PC1 a PC2, které odpovídají normalizovanému zastoupení jednotlivých analytů ve skupině seskviterpeny, jednotlivé vektory odpovídají značení analytů v tabulce (Tabulka 1)

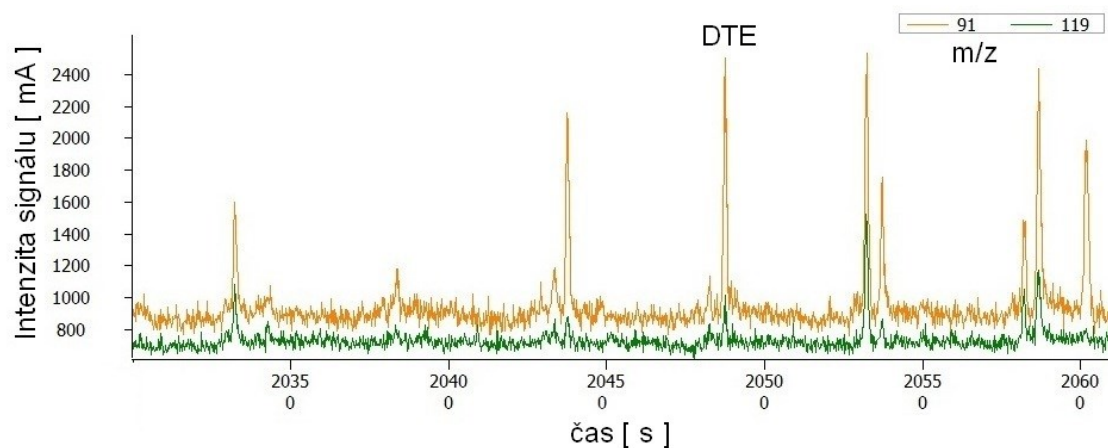
4.3 Měření a derivatizace látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol

Produkce látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol (DTE) byla měřena ve vzorcích připravených extrakcí kolonií houby *G. trabeum* kultivovaných na pevném agar -celulózové médiu pro oba kmeny Brno a Březnice. Vzorky kultivované ve vodném médiu obsahujícím různé druhy sacharidů (maltózu, fruktózu, sacharózu, xylózu a manózu) byly připraveny z kolonií houby *G. trabeum* kmen Brno. Pro kmen Březnice nebyla vodná média měřena.

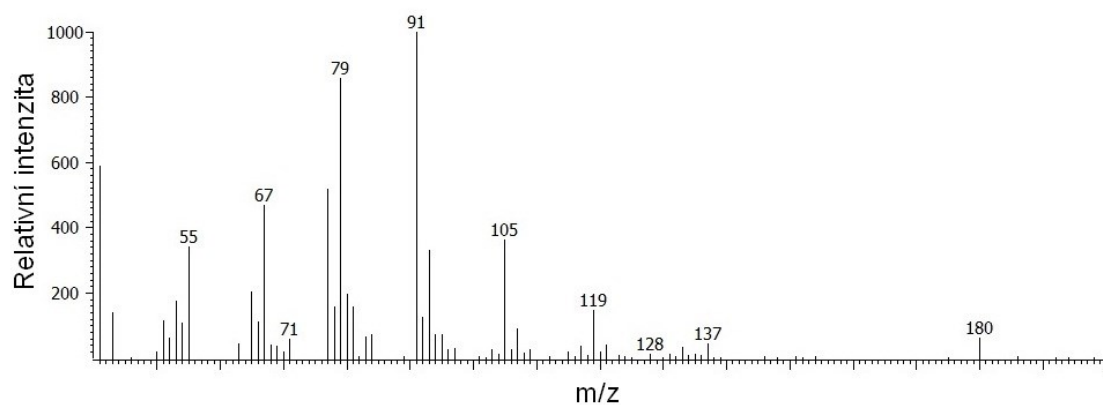
Naměřený chromatogram standardu (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu (Obrázek 25) a naměřené hmotnostní spektrum standardu dodekatrienolu (Obrázek 27) sloužily k určení retenčního času a hmotnostního spektra příslušného píku dodekatrienolu ve vzorcích kolonií houby *G. trabeum*, retenční čas pro standard dodekatrienolu byl na primární koloně 2040 sekund a sekundární koloně 3,6 sekund, z hmotnostního spektra je zřejmý nejvíce zastoupený fragment iontu m/z 91 a iont m/z 119, je viditelný i molekulový iont m/z 180. Pro potvrzení pozitivního výsledku v případě naměření látky dodekatrienol ve vzorcích, byla provedena derivatizace dodekatrienolu silylačním činidlem BSA, z naměřeného chromatogramu silylovaného standardu dodekatrienolu (DTE-BSA) (Obrázek 29) byl zjištěn retenční čas na primární koloně 2275 sekund a sekundární koloně 2,6 sekund, z hmotnostního spektra (Obrázek 31) byly vybrány dva iontové fragmenty m/z 119 a m/z 162.



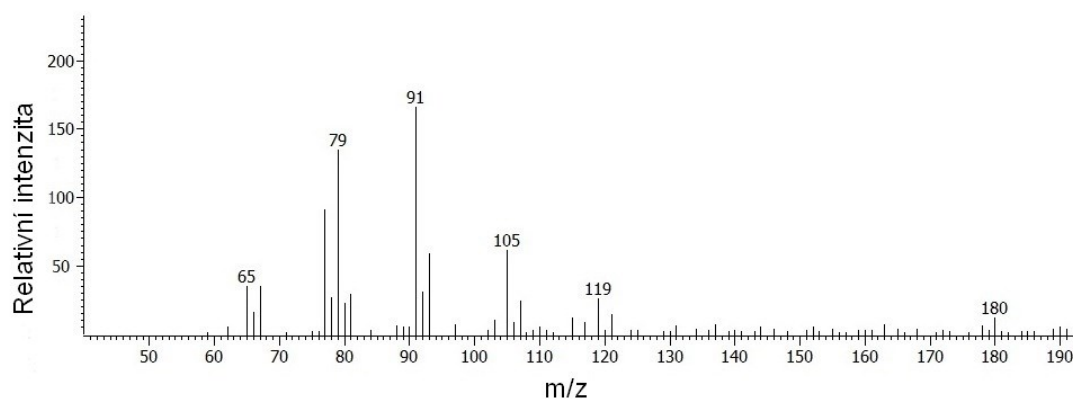
Obrázek 25 Chromatogram naměřeného standardu (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu, zobrazený záznam v dekonvolučním módu pro m/z 91 a 119, zobrazená oblast retenčních časů 2030 – 2060s, retenční čas DTE standardu 2040; 3,6s



Obrázek 26 Chromatogram naměřeného vzorku CAB 3, *G. trabeum*, kmen Brno, agar-celulózové médium; zobrazený záznam v dekonvolučním módu pro m/z 91 a 119; zobrazená oblast retenčních časů 2030 – 2060s; retenční čas DTE 2045, 3,6s



Obrázek 27 Hmotnostní spektrum naměřeného standardu (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu



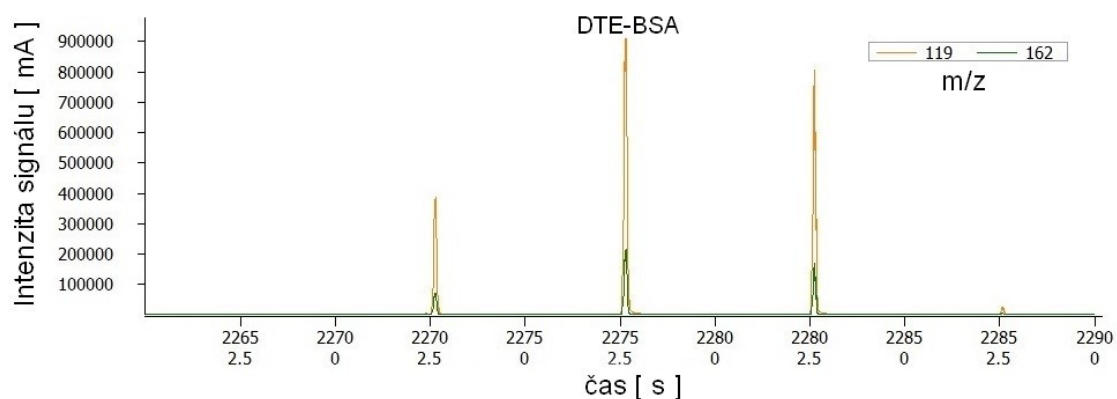
Obrázek 28 Hmotnostní spektrum naměřeného dodekatrienolu ve vzorku CAB 3., *G. trabeum*, kmen Brno, agar-celulózové médium

Pozitivní výsledek produkce látky dodekatrienol houbou *G. trabeum* byl naměřen pouze ve vzorku CAB 3. a v duplikátně připraveném vzorku CAB 2.. Tyto vzorky byly připraveny z hexanových extraktů kolonií houby *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaných na pevném agar - celulóзовé médiu. Chromatogram měření vzorku CAB3 je zobrazený na obrázku (Obrázek 26), příslušné zaznamenané hmotnostní spektrum je zobrazeno na obrázku (Obrázek 28), a je shodné s měřením standardu dodekatrienolu (Obrázek 27). Retenční čas dodekatrienolu ve vzorku CAB3 byl 2045 sekund na primární koloně a 3,6 sekund na sekundární koloně, od měření standardu dodekatrienol se lišil o jednu modulační dobu modulátoru, tedy 5 sekund na primární koloně, což je ve shodě s principy fungování měřicího systému komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie.

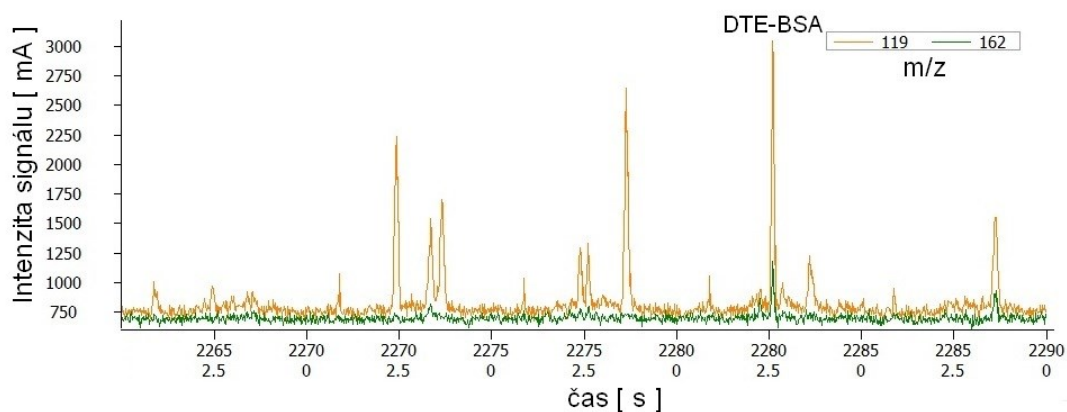
Následně byla provedena derivatizace (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu naměřeného ve vzorku CAB 3. pomocí silylačního činidla BSA, naměřený chromatogram (Obrázek 30) produktu silylační reakce DTE-BSA a jeho příslušné hmotnostní spektrum (Obrázek 32) byly ve shodě s daty z měření silylovaného standardu DTE-BSA (Obrázek 29) a (Obrázek 31). Retenční čas vrcholu píku DTE-BSA v derivatizovaném vzorku CAB 3. byl 2280 sekund na primární koloně a 2,6 sekund na sekundární koloně, od měření standardu DTE-BSA se lišil o jednu modulační dobu modulátoru, 5 sekund, na primární koloně, což je ve shodě s principy fungování měřicího systému komprehensivní dvoudimenzionální plynové chromatografie.

Přítomnost látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol nebyla naměřena v hexanových extraktech připravených z kolonií houby *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaných ve vodných roztocích pro žádný z použitých sacharidů.

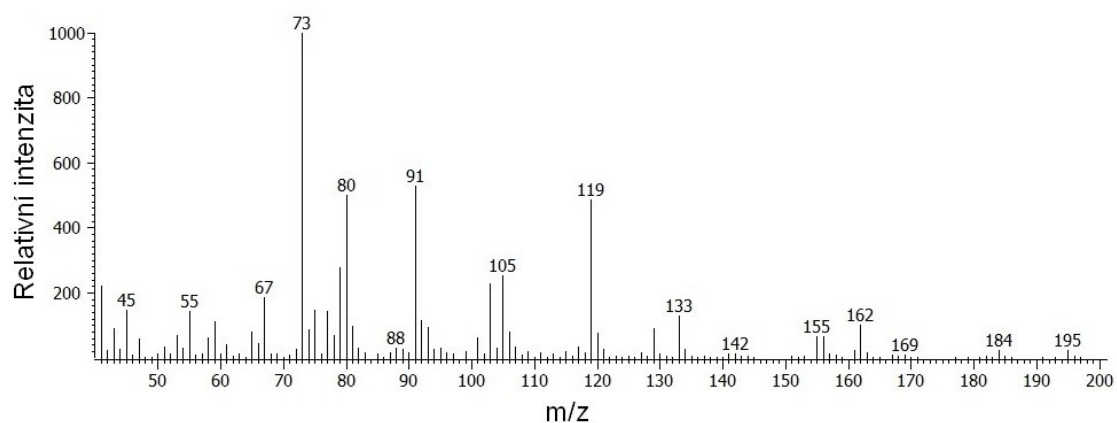
Přítomnost látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol nebyla naměřena v hexanových extraktech připravených z kolonií houby *G. trabeum*, kmen Březnice, kultivovaných na pevném agar - celulóзовé médiu.



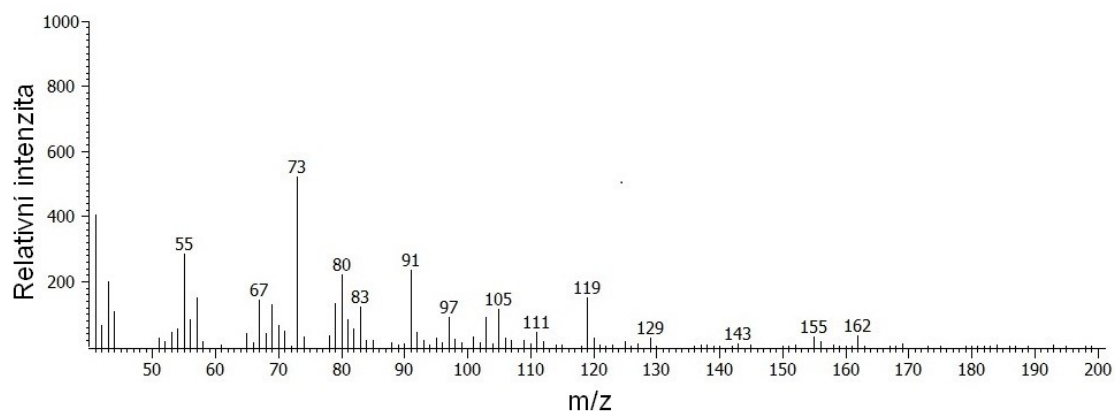
Obrázek 29 Chromatogram naměřeného silylovaného standardu (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu, zobrazený záznam v dekonvolučním módu pro m/z 119 a 162, zobrazená oblast retenčních časů 2260 – 2290s, retenční čas DTE - BSA standardu 2275; 2,6s



Obrázek 30 Chromatogram naměřeného silylovaného vzorku CAB 3., *G. trabeum*, kmen Brno, agar-celulózové médium; zobrazený záznam v dekonvolučním módu pro m/z 119 a 162; zobrazená oblast retenčních časů 2260 – 2290s; retenční čas DTE - BSA 2275; 2,6s



Obrázek 31 Hmotnostní spektrum naměřeného produktu derivatizace standardu (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-olu se silylačním činidlem BSA



Obrázek 32 Hmotnostní spektrum naměřeného produktu derivatizace dodekatrienolu se silylačním činidlem BSA ve vzorku CAB 3., *G. trabeum*, kmen Brno, agar-celulózové médium

5 DISKUZE

Pro identifikaci těkavých organických látek produkovaných houbou *G. trabeum* byla použita pokročilá separační technika plynové chromatografie GC×GC-TOFMS. Doposud nebyl naměřen podrobný profil organických těkavých látek, které produkuje houba *G. trabeum*. Použití techniky GC×GC-TOFMS se jeví jako ideální, protože dosahuje vysokého rozlišení a je schopna provést separaci složitých směsí, které obsahují látky se stejnou těkavostí. Naměřená data byla porovnána s dostupnými údaji o naměřených těkavých organických látkách produkovaných příbuznou houbou patřící do stejného rodu *G. odoratum*. Dále byla naměřená data porovnána s dostupnými naměřenými profily těkavých organických látek produkovaných jinými dřevokaznými houbami. Hlavním úkolem práce bylo zjistit, zda houba *G. trabeum* produkuje látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol, která je hlavní složkou stopovacího feromonu u některých druhů termitů (Matsamura et al., 1976). Vedlejšími úkoly pak bylo semikvantitativně vyhodnotit, zda produkce těkavých sekundárních metabolitů houby *G. trabeum* závisí na sacharidu přítomném v kultivačním médiu, který slouží jako zdroj uhlíku pro její metabolismus.

Látka (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol byla obsažena ve stopovém množství v hexanových extraktech houby *G. trabeum*, kmen Brno, kultivované v Petriho miskách na agar - celulóзовém pevném médiu. Negativní výsledek produkce dodekatrienolu byl naměřen pro vzorky *G. trabeum*, kmen Březnice, kultivovaných v Petriho miskách na agar - celulóзовém pevném médiu. Stejně tak byla negativní měření dodekatrienolu ve vzorcích *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaných ve vodných roztocích obsahujících maltózu, fruktózu, sacharózu, xylózu či manózu. Pozitivní výsledek byl podpořen úspěšnou derivatizací dodekatrienolu silylačním činidlem BSA. Proč vzorky připravené z houby *G. trabeum*, kmen Brno, kultivované ve vodných roztocích v přítomnosti různých sacharidů neobsahovaly látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol, zatímco vzorky houby *G. trabeum* připravené ze stejného kmene, kultivované na Petriho miskách byly schopné dodekatrienol produkovat, je předmětem diskuze. Může se jednat o potlačení produkce látky dodekatrienol v důsledku jiného prostředí, ve kterém je houba kultivovaná. Na Petriho miskách je kultivovaná při stálé vzdušné vlhkosti, Petriho misky jsou otočeny dnem vzhůru, aby nedocházelo k zadržování vody v houbovém myceliu. Naproti tomu kolonie *G. trabeum* kultivované ve vodných roztocích jsou celým svým

objemem ponořeny pod hladinou vody a s roztokem je neustále mícháno. Takový rozdíl vnějšího prostředí, ve kterém probíhá kultivace, by mohl vést k morfologickým změnám houby a produkci jiných sekundárních metabolitů nebo ke změně v produkovaném množství stejných sekundárních metabolitů. Ve studii, která poprvé zmiňovala produkci dodekatrienolu houbou *G. trabeum* (Matsamura et al., 1976), byly vzorky připraveny kultivací na Petriho miskách, nikoliv ve vodných roztocích, takže naměřený výsledek je ve shodě se zmíněnou studií. Za zmínku stojí, že produkce dodekatrienolu byla naměřena pouze u kmene Brno houby *G. trabeum* kultivované na pevném médiu, pro druhý kmen, kmen Březnice nebylo jeho množství naměřeno. Jedním z vysvětlení, může být, že *G. trabeum*, kmen Březnice produkovala dodekatrienol ve velice nízkém množství, takže jeho naměření nebylo možné, protože jeho množství ve vzorcích bylo pod mezí detekce detektoru hmotnostního spektrometru.

Bylo naměřeno 71 produkovaných sekundárních metabolitů (Tabulka 1), z toho jich bylo 54 kvalitativně identifikováno pomocí naměřených příslušných hmotnostních spekter a vypočtených retenčních indexů. Identifikované látky byly porovnány s výskytem v dostupné specializované literatuře zabývající se studiem těkavých látek produkovaných houbami. Z důvodu použití techniky GC×GC-TOFMS, která poskytuje vysoké rozlišení pro separaci komplexních směsí, bylo možné identifikovat velké množství produkovaných sekundárních metabolitů houbou *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovanou ve vodných roztocích obsahujících různé druhy sacharidů, jejichž produkce doposud nebyla pozorována. Mezi látky, jejichž produkce byla již dříve naměřena v dřevokazných houbách, patřil analyt okt-1-en-3-ol (1), jeho produkce byla popsána u dřevokazných hub *Gloeophyllum odoratum* (Hanssen et al., 1986), *Fomitopsis pinicola* a *Piptoporus betulinus* (Rösecke et al., 2000) a mnoha dalších. Tento alkohol patří mezi nejrozšířenější metabolity hub, jeho produkce byla popsána u mnoha desítek druhů, jeho biosyntéza probíhá z degradace kyseliny linolové (Bennett et al., 2012). Analyt oktan-3-on (6), jedná se o keton, jehož produkce byla popsána u dřevokazných hub *F. pinicola* a *P. betulinus* (Rösecke et al., 2000) pro *G. trabeum* dosud nebyla jeho produkce pozorována. Produkce analytu methylester kyseliny fenylctové (24) byla popsána pro *G. odoratum* (Hanssen et al., 1986). Produkce analytu daucen (53), patřící do skupiny látek seskviterpeny, byla popsána pro houbu *G. odoratum* (Rösecke et al., 2000). Produkce analytu (2*E*,4*E*)-dekadienal (71), patřící do skupiny látek aldehydy, byla

popsána pro houby *G. odoratum*, *F. pinicola*, *P. betulinus* (Rösecke et al., 2000), zřejmě se jedná o typický sekundární metabolit dřevokazných hub. V této práci byl popsán i geometrický izomer této látky (2*E*,4*Z*)-dekadienal, což je nový poznatek, dosud nepublikovaný, jeho identifikace proběhla na základě záznamu hmotnostního spektra a porovnání vypočteného retenčního indexu s uvedeným v odborné literatuře (Adams, 2009). Produkce analytů kyselina palmitová (18) a kyselina linolová (19) byla popsána pro *G. odoratum* (Kahlos et al., 1994). Produkce ostatní identifikovaných analytů popsaných v této práci nebyla dosud pro dřevokazné houby v dostupné odborné literatuře publikována. Z celkového počtu 26 naměřených seskviterpenů jich bylo pouze 9 identifikováno, zbylých 17 seskviterpenů se nepodařilo identifikovat z důvodu nedostatečných zdrojů. Samotná identifikace seskviterpenů je velice obtížná, bez použití standardů těchto látek, nicméně i neidentifikované seskviterpeny byly semikvantitativně vyhodnoceny, zda nedochází k jejich významné produkci v prostředí některého ze sacharidů.

Zvolenou metodikou práce pro vzorkování *G. trabeum*, kmen Brno připravených kultivací v živných roztocích obsahujících různé sacharidy, bylo možné pozorovat vliv sacharidů na produkci 71 naměřených těkavých organických látek touto houbou. Toho bylo dosaženo tím, že všechny extrakty byly připravené tak, aby obsahovaly stejné množství vnitřního standardu, zároveň byla známa hmotnost sušiny houby, ze které byly extrakty připraveny. Z těchto údajů byla vypočtena hmotnostní plocha pro každý analyt (Tabulka 1), která charakterizovala množství produkovaného analytu na jednotku navážky sušiny *G. trabeum*. Takto naměřené výsledky nabývaly absolutních hodnot a bylo možné porovnávat přímý vliv sacharidů na produkci jednotlivých analytů v závislosti na prostředí kultivace. Ačkoliv bylo možné porovnat naměřené analyty mezi sebou v absolutních množstvích, zvolená metodika má určitá omezení, velice důležité je, aby byla známá přesná navážka sušiny biologického materiálu. Toho lze dosáhnout pouze, když vzorkovaný biologický materiál neobsahuje nečistoty, které by mohly ovlivňovat váhu sušiny. To byl problém například při přípravě vzorků kultivovaných v prostředí sacharidu celulózy. Celulóza je nerozpustná ve vodě, takže promývání filtračního koláče, nevedlo k odstranění zbytků tohoto sacharidu. Takto připravený filtrační koláč z kolonií *G. trabeum* obsahoval v celém svém objemu kusy pevných celulóзовých vláken, které znemožnily jeho přesné navážení a navazující

semikvantitativní analýzu. Pro takové vzorky je postup použitý v této práci nevyhovující a je třeba k řešení problému použít jiný přístup. Například metodu vnitřní normalizace, kdy množství analytu je vyjádřeno ve formě procentuálního zastoupení z celkové sumy všech naměřených ploch pík analytů (Dettmer-Wilde a Engewald, 2014). Vyhodnocení naměřených výsledků bylo provedeno vícerozměrnou statistickou metodou analýzy hlavních komponent, která umožnila porovnat rozptyl naměřených hodnot jednotlivých analytů mezi jednotlivými vzorky. Množství analytů naměřené v různých vzorcích je uvedeno v tabulce (Tabulka 1), podrobný rozbor výsledků PCA analýzy je uvedený v kapitole 4.2 Statistické vyhodnocení naměřených výsledků. Byl pozorován vliv sacharidu fruktózy na zvýšení produkce těchto analytů: ethylester kyseliny dodekanové (34), ethylester kyseliny tridekanové (35), ethylester kyseliny tetradekanové (36), ethylester kyseliny palmitové (39), methylester kyseliny linolové (40), ethylester kyseliny heptanové (41), daucen (55), seskviterpen 11 (60), β -bisabolen (63), δ -amorphen (65), dauca-4(11)-dien (66) a seskviterpen 18 (72). Vliv fruktózy byl dokázán porovnáním výsledků měření ze vzorků kultivovaných v prostředí maltózy a sacharózy. Pokud byl vysoký obsah jak v sacharóze tak fruktóze, ale v maltóze bylo naměřeno nízké množství, tak to vede k závěru o pozitivním vlivu fruktózy na produkci těchto analytů a naopak, pokud bylo nízké množství ve fruktóze a srovnatelně vysoké v maltóze a sacharóze, tak to vede k závěru o pozitivním vlivu glukózy získané z maltózy na produkci analytů. Pozitivní vliv glukózy získané z maltózy na produkci sekundárních metabolitů bylo možné pozorovat pro analyty ethylester kyseliny (2*E*)-3-fenylprop-2-enové (32) a methylester kyseliny 5-fenylpentanové (33).

6 ZÁVĚR

Na počátku práce byly vytyčeny dva cíle, zjistit zda produkuje houba *G. trabeum* látku (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol a zda je produkce sekundárních metabolitů touto houbou závislá na sacharidu, tedy zdroji uhlíku pro metabolismus houby, přítomném v kultivačním médiu. Pro analýzu komplexních směsí obsahující mnoho organických těkavých látek se stejným bodem varu byla použita pokročilá separační technika plynové chromatografie GC×GC-TOFMS, která poskytuje vysoké chromatografické rozlišení a vysokou míru selektivity. V kombinaci s hmotnostním spektrometrem jako detektorem tato technika poskytuje kvalitativní informaci o měřených analytech, což v kombinaci s použitím retenčních indexů jednotlivých analytů vede k jejich jednoznačné identifikaci.

První úkol práce, tedy produkce látky (3Z,6Z,8E)-dodekatrien-1-ol houbou *G. trabeum*, byl splněn v částečném rozsahu, bylo dokázáno, že *G. trabeum* produkuje za jistých podmínek látku dodekatrienol. Produkce byla zjištěna pouze pro kmen Brno, který byl získaný z instituce Lesnická a dřevařská fakulta Mendelovy univerzity v Brně, a produkce dodekatrienolu byla naměřena pouze pro vzorky kultivované na pevném agar-celulózovém médiu. Pozitivní výsledek byl potvrzen derivatizací dodekatrienolu silylačním činidlem BSA. Pro vzorky *G. trabeum* kultivované v kapalném médiu nebyla produkce dodekatrienolu pozorována. Pro druhý poskytnutý kmen Březnice houby *G. trabeum* nebyla produkce dodekatrienolu naměřena, ani ze vzorků kultivovaných na pevném agar - celulózovém médiu.

Druhý úkol, který se zabýval studiem produkce těkavých sekundárních metabolitů houbou *G. trabeum* v závislosti na druhu sacharidu přítomném v kultivačním roztoku. Experiment byl proveden pro 5 různých sacharidů, těmi byly maltóza, fruktóza, sacharóza, xylóza a manóza. Bylo naměřeno celkově 71 různých těkavých organických látek (Tabulka 1) ve vzorcích houby *G. trabeum*, kmen Brno, kultivovaných ve vodném prostředí v přítomnosti různých druhů sacharidů, z toho pro 69 analytů bylo provedeno semikvantitativní porovnání produkce těchto těkavých organických látek mezi jednotlivými vzorky. Houba *G. trabeum* produkovala 5 alkoholů, 2 ketony, 6 aldehydů, 8 karboxylových kyselin, 24 esterů a 26 seskviterpenů. Kvalitativně bylo identifikováno 54 látek, z toho 8 látek bylo již dříve identifikováno a popsáno v odborné literatuře zabývající se studiem těkavých sekundárních metabolitů dřevokazných hub. Ostatní

naměřené analyty byly vůbec poprvé popsány jako produkty dřevokazné houby *G. trabeum*. U osmi analytů byla určena jejich cis-trans izomerie. Byl pozorován vliv sacharidů, které sloužily jako zdroj uhlíku pro metabolismus *G. trabeum*, na produkci sekundárních metabolitů. Použitím vícerozměrné statistické metody analýzy hlavních komponent (PCA) byly identifikovány látky, které mají zvýšenou produkci v prostředí obsahující specifický sacharid. Dále byl pozorován přímý vliv fruktózy a glukózy získané z maltózy na produkci sekundárních metabolitů. Toho bylo dosaženo tím, že jeden ze sacharidů disacharid sacharóza je složen z fruktózy a glukózy, porovnáním produkce v maltóze, fruktóze, sacharóze a ostatních sacharidech bylo možné určit klíčový sacharid, který nejvíce přispívá k produkci specifických sekundárních metabolitů.

7 LITERATURA

- Adahchour M.; Brandt M.; Baier H.; Vreuls R.; Batenburg M. & Brinkman U.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications. *Journal of Chromatography A* **1067**, s.(245-254) (2005).
- Adams R. P.: *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Carol Stream, Allured (2009)
- Arnold L. D. & Aiqi F.: The natural functions of secondary metabolites. In: *History of Modern Biotechnology I*. A. Fiechter (ed.). Berlin, Springer (2001), s.(1-39)
- Attygalle A. B. & Morgan E. D.: Pheromones in nanogram quantities: Structure determination by combined microchemical and gas chromatographic methods *Angewandte Chemie International Edition in English* **27**:4, s.(460-478) (1988).
- Bagnères A. G. & Hanus R.: Communication and social regulation in termites. In: *Social recognition in invertebrates: The knowns and the unknowns*. L. Aquiloni & E. Tricarico (eds.). Paris, Springer (2015), s.(193-248)
- Comprehensive analytical chemistry 55. Barcelo D. (ed.) Netherlands, Elsevier 2009
- Bennett J. W.; Hung R.; Lee S. & Padhi S.: Fungal and bacterial volatile organic compounds: An overview and their role as ecological signaling agents. In: *Fungal Associations*. B. Hock (ed.). Berlin, Springer (2012), s.(373-393)
- Bordereau C. & Pasteels J. M.: Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. In: *Biology of termites, a modern synthesis*. D. E. Bignell & Y. Roisin (eds.). Dordrecht, Springer (2011), s.(279-320)

- Cavagnino D.; Magnini P.; Zilioli G. & Trestianu S.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography using large sample volume injection for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in complex matrices. *Journal of Chromatography A* **1019**, s.(211-220) (2003).
- Cochran J.: Fast gas chromatography time-of-flight mass Spectrometry of polychlorinated biphenyls and other environmental contaminants. *Journal of chromatographic science* **40**:5, s.(254-268) (2002).
- Costa-Leonardo A.; Casarin F. & Lima J.: Chemical communication in isoptera. *Neotropical Entomology* **38**, (2009).
- Cottier F. & A Mühlschlegel F.: Communication in fungi. *International journal of microbiology* **2012**, ID 351832, s.(9 stran) (2012).
- Dallüge J.; Beens J. & Brinkman U.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *Journal of Chromatography A* **1000**, s.(69-108) (2003).
- Daniel G.; Volc J.; Filonova L.; Plíhal O.; Kubátová E. & Halada P.: Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* Alcohol Oxidase, and extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. *Applied and environmental microbiology* **73**:19, s.(6241-6253) (2007).
- De Koning S.; Janssen H. & Brinkman U.: Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia* **69**:1, s.(33-78) (2009).
- Dettmer-Wilde K. & Engewald W.: *Practical gas chromatography - A comprehensive reference*. England, Springer (2014)
- Esenther G. R.; Allen T. C.; Casida J. E. & Shaenepelt R. D.: Termite attractant from fungus-infected wood. *Science* **134**:3471, s.(50) (1961).

- Focant J.; Sjödin A. & Petterson D.: Qualitative evaluation of thermal desorption-programmable temperature vaporization-comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for the analysis of selected halogenated contaminants. *Journal of Chromatography A* **1019**, s.(143-156) (2003).
- Francke W. & Schultz S.: Pheromones of terrestrial invertebrates. In: *Comprehensive Natural Product II*. D. Barton (ed.). England, Elsevier (1999), s.(153-223)
- Giddings J. C.: Use of multiple dimensions in analytical separations. In: *Multidimensional chromatography*. H. J. Cortes (ed.). New York, Marcel Dekker (1990), s.(1-27)
- Guerrero A.: Inter and intraspecificity of chemical communication. In: *Chemical ecology*. J. D. Hardege (ed.). England, Eolss (2009), s.(416-437)
- Hanssen H. P.; Sinnwell V. & Abraham W. R.: Volatile fragrance compounds from the fungus *Gleophyllum odoratum* (Basidiomycotina). *Zeitschrift für Naturforschung C* **41**, s.(825-829) (1986).
- Hung R.; Lee A. & Bennett J. W.: Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:8, s.(3395-3405) (2015).
- Jensen K.; Houtman C.; Ryan Z. & Hammel K.: Pathways for extracellular fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gleophyllum trabeum* *Applied and environmental microbiology* **67**:6, s.(2705-2711) (2001).
- Joulain D. & König W. A.: *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hamburg, E.B.-Verlag (1998)
- Kahlos K.; Kiviranta J. & Hiltunen R.: Volatile constituents of wild and in vitro cultivated *Gleophyllum odoratum*. *Phytochemistry* **36**:4, s.(917-922) (1994).
- Leclercq A. & Cramers C.: High-speed GC-MS. *Mass spectrometry reviews* **17**:1, s.(37-49) (1998).

- Lee A.; Bartle K. & Lewis A.: A model of peak amplitude enhancement in orthogonal two-Dimensional gas chromatography. *Analytical chemistry* **73**:6, s.(1330-1335) (2001).
- Matsamura F.; Coppel H. C. & Tai A.: Isolation and Identification of Termite Trail-following Pheromone. *Nature* **219**, s.(963-964) (1968).
- Matsamura F.; Nishimoto K.; Ikeda T. & Coppel H. C.: Influence of carbon sources on the production of the termite trail-following substance by *Gleophyllum trabeum*. *Journal of Chemical Ecology* **2**:3, s.(299-305) (1976).
- Meloun M. & Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*. Praha, Academia (2004)
- Millar J. G. & Haynes K. F.: *Methods in chemical ecology*. U.S.A., Kluwer Academics (1998)
- Murphy R. A. & Horgan K. A.: Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi. In: *Fungi - Biology and applications*. K. Kavanagh (ed.). West Sussex, Wiley (2005), s.(126-143)
- Nascimento R. R. & Morgan D. E.: Chemicals involved in the communication system of social insects: their source and methods of isolation and identification, with special emphasis on ants. *Química Nova* **19**:2, s.(156-165) (1996).
- Noirot C.: Glands and secretion. In: *Biology of termites*. K. Krishna & F. M. Weesner (eds.). London & New York, Academic Press (1969), s.(89-123)
- Poliak M.; Kochman M. & Amirav A.: Pulsed flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**:1, s.(189-195) (2008).

- Prebihalo S. E.; Berrier K. L.; Freye C. E.; Bahaghighat H. D.; Moore N. R.; Pinkerton D. K. & Synovec R. E.: Multidimensional Gas Chromatography: Advances in Instrumentation, Chemometrics, and Applications. *Analytical Chemistry* **90**:1, p.(505-532) (2018).
- Procházková D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovené obsahu analytů. *Chemické listy* **96**, p.(827-852) (2002).
- Regnier E. F. & Law H. J.: Insect pheromones. *Journal of Lipid Research* **9**:1968, p.(541-551) (1968).
- Rösecke J.; Pietsch M. & A. König W.: Volatile constituents of wood-rotting Basidiomycetes. *Phytochemistry* **54**, p.(747-750) (2000).
- Saran R. K.; Millar J. G. & Rust M. K.: Role of (3Z,6Z,8E)-dodecatrien-1-ol in trail following, feeding, and mating behavior of *Reticulitermes hesperus*. *Journal of Chemical Ecology* **33**:2, p.(369-389) (2007).
- Soria A. C.; Garcia-Sarrio M. J. & Sanz M. L.: Volatile sampling by headspace techniques. *Trends in analytical chemistry* **71**, p.(85-99) (2015).
- Sillam-Dussès D.; Hanus R.; Jiroš P., Krasulová J., Kalinová B., Valterová I., Šobotník J.: Sex pheromone and trail pheromone of the sand termite *Psammotermes hybostoma*. *Journal of Chemical Ecology* **37**:2, s.(179-188) (2011).
- Traniello J.: Recruitment and orientation components in a termite trail pheromone. *Naturwissenschaften* **69**, p.(343-344) (1982).
- Valterová I. & Urbanová K.: Chemické signály čměláků. *Chemické listy* **91**, p.(846-857) (1997).

Van Den Dool H. & Kratz P. D.: A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **11**, p.(463-471) (1963).

Wallace E. W.: Mass spectra. In: *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* P. J. Linstrom & W. G. Mallard (eds.). National Institute of Standards and Technology (2018a), Dostupné z adresy: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>> [cit. 10.5.2019]

Wallace E. W.: Retention indices. In: *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* P. J. Linstrom & W. G. Mallard (eds.). National Institute of Standards and Technology (2018b), Dostupné z adresy: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>> [cit. 10.5.2019]

Zaynab M.; Fatima M.; Abbas S. & Sharif Y.: Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis* **124**, p.(198-202) (2018).